



Biocapteur pour la surveillance de la qualité de l'eau : Application aux eaux pluviales et de stations d'épurations

Loic Recoules

► To cite this version:

Loic Recoules. Biocapteur pour la surveillance de la qualité de l'eau : Application aux eaux pluviales et de stations d'épurations. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30181 . tel-01330750

HAL Id: tel-01330750

<https://theses.hal.science/tel-01330750>

Submitted on 13 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Loïc Recoules

le 22 Septembre 2015

Titre :

BIOCAPTEUR POUR LA SURVEILLANCE DE LA QUALITE DE L'EAU.
APPLICATION AUX EAUX PLUVIALES ET DE STATIONS D'EPURATIONS.

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED GEET : Micro et Nanosystèmes

Unité de recherche :

LAAS-CNRS

Directeur/trice(s) de Thèse :

Anne-Marie Gué

Ali Boukabache

Jury :

Corinne Dejous - Rapporteur

Vincent Senez - Rapporteur

Christine Lafforgue-Baldas - Examinatrice

Gérald Thouand - Examineur

Alain Cazarre - Examineur

Remerciements

Plus de trois ans se sont maintenant écoulés. C'est à la fois avec bonheur et tristesse que j'écris ces quelques lignes de remerciements. Une sacrée expérience qu'est la thèse...

Ces quelques années passées au LAAS m'ont quelques peu changé, scientifiquement parlant mais surtout personnellement. Sortant des bancs de l'école, je ne savais pas ce que j'allais trouver dans le monde de la recherche. Je suis entré avec l'hypothèse d'un monde d'intellos pour qui les maîtres-mots étaient : "travail", "sciences" et "recherche". Après analyse de cette expérience, j'en conclus que... je me suis trompé !

J'ai trouvé en ce lieu, un cadre de travail exceptionnel, propice à l'échange dans une bonne ambiance. Cette ambiance est due principalement à la diversité des personnes que l'on peut rencontrer. C'est pourquoi la liste des personnes à remercier est relativement longue. En premier lieu, je vais remercier Yves Primault, de la société BIONEE, qui m'a employé durant ces trois années. Je remercie bien sûr les personnes qui m'ont encadré : mon directeur de thèse Ali Boukabache et Daniel Esteve pour son expérience du monde de la recherche. Je remercie également les personnes avec qui j'ai pu travailler, échanger, en toute simplicité sur ce projet : Gérald Thouand et Sullivan Jouanneau du GEPEA-CEBAC (Université de Nantes). Je ne peux oublier le personnel des services techniques du LAAS, qui m'ont appuyé pour mener à bien ce projet : Sandrine Souleille, Xavier Dollat, Denis Lagrange, Laurent Mazenq et Gauthier Petit.

Mes remerciements vont également aux collègues, et amis, du laboratoire avec lesquels j'ai beaucoup échangé, scientifiquement bien sûr, mais aussi de bonne blague, quelques fois autour d'un repas, plus souvent autour d'une bière (ou plus...) mais surtout autour d'un café. Merci donc à (l'ordre d'apparition des noms n'est en aucun cas une quelconque signification de préférence !!) : Joris, Vincent, Marc, Hubert, Sébastien C., Sébastien M., Antoine, Charline, Cyril, Catherine, Stéphane, Marius, Sandrine, Ludo, Théo, Sabri, Brioux, Nicolas...

J'aimerais aussi remercier des personnes extérieures au laboratoire, mes amis, certains d'enfance et d'autres de l'université. Heureusement que vous étiez là pour me changer les idées, me faire rire, durant les moments difficiles. Merci pour tout !

Je ne pourrais terminer en remerciant les personnes les plus proches, mes parents pour leur indéfectible soutien durant toutes ces années, mes deux frères Vincent et Julien. Et bien sûr Manue, avec qui je partage de très belles années et qui a été là quand j'avais besoin de réconfort et de soutien (surtout pendant la rédaction).

Table des matières

Remerciements

Introduction générale	1
1 Contexte et positionnement de l'étude	5
1.1 La Demande Biologique en Oxygène (DBO ₅) : un paramètre important	5
1.1.1 Qu'est-ce que c'est ?	5
1.1.2 Méthodes standards et outils pour la mesure de la DBO ₅	7
1.2 Les bactéries : un outil pour l'évaluation de la qualité de l'eau	9
1.2.1 Description des bactéries	9
1.2.2 Modélisation de la croissance bactérienne	12
1.2.2.1 Modèle exponentiel	13
1.2.2.2 Modèle Logistique	14
1.2.2.3 Modèles avec temps de latence	14
1.2.3 Les bactéries dédiées à la mesure de la DBO	15
1.2.4 L'évaluation de la toxicité : bactéries ou algues ?	17
1.3 Les avancées dans le domaine de la DBO : état de l'art	19
1.3.1 Les méthodes standards modifiées	20
1.3.2 Bioluminescence bactérienne	22
1.3.3 Les piles à combustible microbiennes	22
1.3.4 Utilisation d'un médiateur redox pour la mesure de la DBO	24
1.3.5 Biocapteur à base de bactéries immobilisées sur électrode	27
1.3.6 Biocapteur basé sur des technologies de bioréacteurs ou chemostat	30
1.3.7 Un regard critique sur les systèmes actuels de DBO	31
1.4 La microtechnologie au service de l'environnement ; le projet Bioguard au cœur de la problématique	33
2 Conception du capteur	35
2.1 Cahier des charges du projet	35
2.2 Analyse du cahier des charges	36
2.3 Capteurs pour l'évaluation de la DBO	38

Table des matières

2.3.1	Un capteur d'oxygène dissous : l'optode	39
2.3.2	Un capteur réparti : la résazurine	41
2.4	Systèmes fluidiques « macro » et « micro »	42
2.4.1	Le système à macro-volume	42
2.4.1.1	Son architecture	42
2.4.1.2	Génération du gradient de concentration	45
2.4.1.3	La conception des réservoirs de mesure	50
2.4.2	Conception et dimensionnement de la version « micro » : la bio-puce	52
2.4.2.1	Les contraintes de conception des biopuces	53
2.4.2.2	Première génération de puce	55
2.4.2.3	L'amélioration de la puce : deuxième génération	56
2.5	Instrumentation et système de mesure	57
2.5.1	Instrumentation des capteurs	57
2.5.1.1	Lecteur optique de l'optode	57
2.5.1.2	Lecteur optique de la résazurine	57
2.5.2	Gestion du système et de l'environnement de mesure	59
2.6	Conclusion	60
3	Procédés technologiques et fabrication	61
3.1	L'automate de mesure en milli-volume	61
3.1.1	Fabrication et assemblage des réservoirs milli-volumiques	61
3.1.2	Intégration du capteur	63
3.1.3	Intégration de l'électronique de commande et contrôle de l'environnement	63
3.2	Des biopuces en technologie Verre-PDMS	65
3.2.1	Description des principales étapes de fabrication d'une biopuce	65
3.2.2	Les masques pour la photolithographie	65
3.2.3	Structuration de la SU8 par photolithographie	67
3.2.3.1	Préparation du substrat	67
3.2.3.2	Dépôt de la résine photosensible	67
3.2.3.3	Premier recuit (soft-bake)	68
3.2.3.4	Insolation de la résine	68
3.2.3.5	Post-exposure bake	68
3.2.3.6	Développement	68
3.2.4	Fabrication des dispositifs en PDMS d'épaisseur contrôlée	69
3.2.5	L'étape d'assemblage des puces	70
3.2.5.1	Intégration de l'optode et assemblage	70
3.2.5.2	Cas de la résazurine	73
3.3	Réalisation d'un banc expérimental pour la mesure de fluorescence de la résorufine	74
3.3.1	Le système de lecture optique	74

3.3.2	Sélection et caractérisation des composants	75
3.3.3	Connexions fluidiques	80
3.3.4	Électronique et programme de commande	80
3.4	Les technologies de la biologie : de la culture à l'expérimentation	83
3.4.1	Les milieux biologiques	83
3.4.1.1	Le milieu de culture LB	83
3.4.1.2	Le milieu minimum M9	83
3.4.2	Estimation de la population bactérienne	84
3.4.3	Protocole de préparation des bactéries	84
3.5	Conclusion	85
4	Résultats expérimentaux et interprétations	87
4.1	Principaux résultats expérimentaux	87
4.1.1	Mesure de la consommation bactérienne en oxygène sur le macrosystème à optodes	87
4.1.1.1	Effet de la concentration en carbone organique sur la consommation des bactéries	88
4.1.1.2	Effet de la densité de population sur la vitesse de dégradation	89
4.1.1.3	Analyse des performances et limites du système	91
4.1.2	Mesure de la consommation bactérienne sur biopuce avec optode	93
4.1.2.1	Premiers résultats	93
4.1.2.2	Porosité du PDMS	93
4.1.2.3	Réduction de la diffusion de l'oxygène dans la biopuce	95
4.1.3	Corrélation micro/macro système	96
4.1.4	Expérimentation avec résazurine	97
4.1.4.1	Dégradation du milieu M9 à concentration en glucose contrôlée	98
4.1.4.2	Effet de la température sur l'activité bactérienne	99
4.1.4.3	Influence des paramètres optiques sur la mesure	100
4.2	Évaluation de la charge carbonée par une approche théorique	101
4.2.1	Expression de l'intensité de fluorescence de la résorufine par un modèle bio-phénoménologique	101
4.2.2	Étude des paramètres des modèles	102
4.2.2.1	Rendement de biomasse produite par carbone organique dégradé $Y_{cell/C}$	103
4.2.2.2	Coefficient de conversion du carbone organique oxydé en intensité lumineuse $K_{V/C}$	103
4.2.3	Application à la fluorescence de la résorufine	104
4.2.3.1	Approximation des paramètres du modèle de Verhulst	104
4.2.3.2	Évaluation des paramètres du modèle de Verhulst à charge carbonée variable	107
4.2.4	Quels paramètres pour la prédiction de la DBO?	109

Table des matières

4.3 Conclusion	110
Conclusion générale et perspectives	113
Bibliography	128
Annexes	129
A L'écoulement en microfluidique	129
A.1 Équations des écoulements	129
A.2 Écoulement fluide au sein d'une canalisation circulaire	130
A.3 Écoulement fluide au sein d'une canalisation rectangulaire	131
A.4 Analogie avec les circuits électriques	132
B Validation du gradient	134
C Écriture du modèle de Verhulst sous une forme affine	136

Introduction générale

Ce travail de thèse, dirigé par Madame A-M. Gué et Monsieur A. Boukabache, s'inscrit dans les activités de l'équipe *Nano Ingénierie et Intégration des Systèmes* (N2IS) du LAAS-CNRS, consacrées au développement des microsystèmes fluidiques. Il explore, pour la première fois, la possibilité d'appliquer les technologies fluidiques bio-puces à la réalisation de fonctions impliquant une culture cellulaire embarquée.

Le domaine d'application de notre travail concerne la mesure de la concentration en matière carbonée des eaux traitées dans les stations d'épuration puis rejetées dans l'environnement. De façon générale, dans le cycle de l'eau, la partie carbonée des eaux est traitée par les cultures bactériennes qui s'y développent spontanément. La conduite de ces stations suppose, donc, de contrôler régulièrement la qualité d'épuration à travers la teneur en matières nourricière et bactérienne, processus évalué par la Demande Biologique en Oxygène (DBO) d'un échantillon d'eau.

La mesure de cet indicateur de qualité des eaux traitées est une nécessité dans la gestion des eaux usées. Chaque organisation, chaque famille, rejette quotidiennement ses eaux usées qui sont collectées à travers les 250.000 kms de canalisations en France. Les milliers de stations d'épuration leur font alors subir des traitements bactériens d'oxydation, qui détruisent les matières carbonées, jusqu'à renvoyer ces eaux purifiées dans le milieu naturel. La conduite de ces stations d'épuration implique une parfaite connaissance de l'évolution des matières carbonées présentes dans les fluides à traiter. A l'heure actuelle, la pratique standardisée de contrôle de qualité des eaux traitées s'opère par prélèvements et tests en laboratoire sur 5 jours courants, identifiés par l'appellation DBO₅.

L'intérêt des biologistes pour la recherche de la mesure de ce paramètre par voie cellulaire et notamment par la mise en œuvre de bactéries apparaît à travers la prise en compte de l'épuration « naturelle » des eaux de rejet. En outre, la maîtrise d'une DBO différenciée permet d'imaginer de contrôler, sur le long terme, lesensemencements bactériens pour parfaire les épurations. Pour ce faire, il faut établir, par des mesures systématiques, les relations entre le type des bactéries et la nature des matières organiques.

L'objectif de ce travail est, donc, la conception et le prototypage d'un dispositif microsystème de mesure de DBO par le suivi de l'évolution de la consommation en oxygène d'une culture cellulaire

choisie. En effet, cette consommation s'opère par oxydation des matières carbonées ce qui témoigne directement de leurs présences dans le milieu testé. Dans un objectif d'identification des polluants, la différenciation des cellules choisies et de leurs conditions environnementales devrait permettre d'évaluer, à travers des mesures en réseau, le taux d'oxygène consommé, et donc de remonter au spectre des espèces organiques présentes dans un échantillon donné.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet, pluridisciplinaire, ANR BIOGUARD (2011-2014). Il a nécessité la mise en place d'une approche associant le monde du « vivant » d'une manière générale à celui des microsystemes. L'étroite collaboration avec les biologistes de l'équipe du CBAC (*Capteurs Biologiques pour l'Analyse et le Contrôle* - Université de Nantes), animée par Monsieur G. Thouand, a permis des interactions à tous les stades de développement du projet et de son expérimentation tant en laboratoire qu'en station expérimentale (SOTRALENTZ). D'un autre côté, l'entreprise BIONEF, par l'entremise d'une convention Cifre BIONEF-LAAS/CNRS, nous a permis de participer à ce programme coopératif et de développer une approche applicative pré-industrielle de ce travail. Les autres partenaires (IETR, Suez Environnement, CSTB, Sotralentz) ont participé à la définition du cahier des charges du projet ainsi qu'aux essais terminaux de qualification.

L'organisation générale du projet BIOGUARD confiait au LAAS-CNRS la conception et le prototypage de la bio puce et de son lecteur, tandis que le laboratoire de Nantes était en charge du choix de bactéries spécialisées.

L'originalité de cette approche est double : imaginer un dispositif et une technologie d'intégration micro fluide pour réaliser une biopuce supportant des bactéries, et lui associer un lecteur miniaturisé capable de fonctionner en site isolé. L'option technique de mise en œuvre de l'instrumentation de mesure et de suivi de l'activité des bactéries sélectionnées à travers leur consommation d'oxygène, est celle d'une mesure optique.

Au démarrage de ce projet, plusieurs questions se sont posées à nous pour concevoir les biopuces : les technologies microsystemes (matériaux, procédés de fabrication, etc. . .) sont-elles compatibles avec la vie cellulaire ? Jusqu'à quel niveau de miniaturisation peut-on aller sans gêner les mécanismes d'oxydations cellulaires ? Comment gérer les injections de fluides et toutes les interfaces entre la biopuce et son environnement d'usage ?

A ces questions générales se rajoutent celles qui concernent directement la conception et le prototypage du couple biopuce et lecteur : quelles technologies d'intégration biopuce mettre en œuvre ? Comment procéder pour intégrer un capteur de mesure d'oxygène dans les canalisations de la biopuce ? Quelles interfaces fluidiques entre la puce et son environnement ? Quels types de tests adopter pour suivre et qualifier les expérimentations ?

Quelques décisions collectives ont permis, initialement, de guider nos réflexions, par exemple l'idée que la biopuce, au stade de la fabrication, recevra des bactéries lyophilisées et qui seront réactivées au

moment de la mesure. Egalement, le choix d'une lecture par fluorescence et la rédaction collective d'un cahier des charges fixant des objectifs d'usage et de coût, nous a permis de présélectionner des matériaux, des techniques de fabrication et de cibler notre vision de la conception de la biopuce.

A partir de ces données, nous avons établi un programme de travail qui a comporté quatre étapes. La première est la conception et le prototypage d'une maquette « macro » réalisant un point de mesure. Ce choix devait nous permettre de prendre la mesure de toute la complexité du projet, de choisir et tester le capteur d'oxygène et de réaliser un prototype pouvant ensuite servir de référence comparative avec la version intégrée envisagée. Il vient naturellement, en deuxième étape, la miniaturisation du point de mesure « macro » vers une biopuce, où la difficulté de conception vient notamment de l'intégration du capteur d'oxygène. Cette étape comporte également une phase de validation des prototypes de biopuces réalisées. Les choix convenus à ce stade doivent permettre la conception d'un lecteur de fluorescence adapté à la biopuce. Dans l'étape suivante, les contributions de l'équipe du CBAC, et des autres partenaires, seront intégrées aux travaux du LAAS-CNRS. Finalement, nous terminerons par une étape de validation expérimentale du couple biopuce-lecteur et de l'analyse des résultats.

La conception et le prototypage de puces micro fluidiques est un axe d'activité important. Il permet de développer des technologies d'intégration microsystemes, c'est à dire de faire cohabiter des technologies hétérogènes dans un même dispositif miniaturisé. Pour le développement de nos biopuces, plusieurs technologies ont été explorées. Les technologies silicium micro-fabriquées sont très performantes, mais couteuses, si l'on n'exploite pas des miniaturisations extrêmes pour bénéficier au maximum de la surface exploitable du substrat. La technologie SU8, résine époxy qui permet de photo-graver parfaitement des épaisseurs de l'ordre du millimètre et pour laquelle le LAAS a déjà développé de nombreuses technologies. La SU8 permet de descendre à des niveaux de miniaturisations importants pour des coûts de revient modérés. La technologie verre-PDMS est explorée par de nombreux laboratoires pour des objectifs de prototypage rapide et en raison de son faible coût d'investissement.

Compte tenu du cahier des charges de BIOGUARD, nous avons pensé qu'il fallait adopter une approche de la biopuce qui soit simple et jetable. Ce qui nous a conduit à proposer des biopuces réalisées sur lame verre de microscope de $26 \times 76 \text{ mm}^2$ et donc avec une technologie PDMS-verre.

Cette thèse, faisant foi de nos travaux de recherches, est présentée en quatre chapitres. Le premier chapitre est consacré à poser le problème et à positionner le projet dans le contexte de l'évaluation de la qualité de l'eau. Nous en rappellerons l'importance sur les plans écologique et sanitaire. Une analyse bibliographique sera décrite, avec d'une part un rappel des technologies utilisées actuellement pour répondre au besoin, et d'autre part les nouveautés ou améliorations apportées aux anciennes technologies.

Le deuxième chapitre expose les démarches de conception du prototype « macro » et du prototype «

Introduction générale

micro ». En premier lieu, nous rappellerons le cahier des charges, puis les technologies des capteurs choisis seront exposées. Nous détaillerons, ensuite, la conception des systèmes fluidiques, dans leurs versions « macro » et « micro », de l'instrumentation des capteurs et de la gestion de l'environnement de mesure.

Le troisième chapitre traite des technologies de fabrication. Les procédés de fabrication des biopuces en verre-PDMS y sont décrits, ainsi que la fabrication du prototype « macro », automate, pour des mesures en des milli-volume. Nous présenterons ensuite la réalisation d'un banc expérimental pour la mesure de la fluorescence. Finalement, les méthodes de cultures bactériennes et les techniques d'évaluation de leur population seront décrites.

Le quatrième et dernier chapitre présente les résultats expérimentaux obtenus avec les différents prototypes que nous avons développés. Nous montrerons les effets de la variation des facteurs d'influence sur la biodégradation par les bactéries. Puis, nous tenterons d'expliquer ces phénomènes d'un point de vue théorique, à l'aide de modèles de croissance bactérienne.

1 Contexte et positionnement de l'étude

La première étape de nos travaux a consisté à définir et appréhender les différentes formes de pollution des eaux de rejet et à leur associer une grandeur d'origine biochimique identifiable et mesurable. Pour ce faire, le concept de DBO fait partie des indicateurs principaux utilisés par les industriels de l'eau pour établir une échelle de qualité.

Dans ce chapitre nous aborderons et développerons, en partant de la définition et de l'évaluation de ce paramètre, les normes permettant de le relier à la concentration en espèces chimiques / biologiques présentes dans un échantillon d'eau. Nous nous intéresserons, à travers une bibliographie exhaustive, aux systèmes, aux capteurs et aux instrumentations utilisés jusqu'à l'heure actuelle, pour mesurer la DBO et la relier aux concentrations en produits polluants. Nous en ferons une analyse critique et à partir de ces bases nous développerons l'approche initiée dans cette étude afin d'aboutir à une démarche s'inscrivant dans une perspective d'amélioration des méthodes et techniques de mesure de la qualité de l'eau.

1.1 La Demande Biologique en Oxygène (DBO₅) : un paramètre important

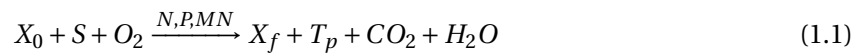
1.1.1 Qu'est-ce que c'est ?

La Demande Biologique en Oxygène (DBO) est un indicateur historique très important et reconnu dans le domaine de la qualité de l'eau. Historiquement, elle a été utilisée pour la première fois en 1908 par la Royal Commission on River Pollution (Angleterre) pour mesurer la pollution organique des rivières [Royal Commission on Sewage Disposal, 1915]. Généralement, quand il s'agit de parler de qualité de l'eau, nous utilisons l'indicateur DBO₅, ce suffixe '5' signifie : 5 jours. Cette traditionnelle période de 5 jours a été choisie pour ce test car il s'agit du temps nécessaire pour que l'eau de la rivière la plus longue d'Angleterre voyage de sa source jusqu'à l'estuaire. Par la suite, ce paramètre a

Chapitre 1. Contexte et positionnement de l'étude

été adopté par la American Public Health Association Standard Methods Committee (APHA) en 1936, en tant qu'indicateur de référence pour l'évaluation de la biodégradabilité des substances chimiques dangereuses pour l'environnement ou la santé [A.P.H.A. American Public Health Association and Greenberg, Arnold E and Trussell et al., 1986]. La dernière norme proposée à ce jour, concernant les rejets de stations d'épuration, est la norme NF EN 1899-1 adoptée depuis mai 1998 par la France. Cette norme s'inscrit dans une directive européenne (La directive cadre sur l'eau), qui vise à donner une cohérence à l'ensemble de la législation avec une politique communautaire globale dans le domaine de l'eau.

La Demande Biologique en Oxygène correspond à la quantité d'oxygène dissous nécessaire aux microorganismes aérobies de l'eau pour dégrader les Matières Organiques Biodégradables (MOB) dissoutes ou en suspension. Durant ce processus, les matières organiques S sont converties par les microorganismes en biomasse microbienne X_f , par une réaction de biodégradation accompagnée de dioxyde de carbone (CO_2) et d'eau (H_2O), comme indiqué par l'équation 1.1 [Jouanneau et al., 2014].



Avec X_0 la biomasse initiale, S la source de carbone organique, O_2 l'oxygène, N la source d'azote, P la source de phosphore, MN les nutriments minéraux, X_f la biomasse finale, T_p les produits de transformation de la biodégradation, CO_2 le dioxyde de carbone et H_2O l'eau.

En quoi le paramètre DBO constitue-t-il un indicateur de la biodégradabilité d'une eau polluée ? Si l'eau analysée contient des matières organiques, elles vont être dégradées par voie biologique, ce qui va entraîner un développement de microorganismes aérobies. Cette prolifération provoquera une chute de l'oxygène dissous dans le milieu récepteur et conduira à l'asphyxie de la faune présente. Cette analyse permet donc de connaître l'impact du rejet dans le milieu récepteur.

La concentration en oxygène dissous est donc mesurée à la prise de l'échantillon, puis une nouvelle fois 5 jours plus tard. La DBO se calcule par la différence des deux mesures et s'exprime en milligramme d'oxygène par litre. La norme NF EN 1899-1 permet de déterminer la DBO par dilution avec une eau saturée en oxygène afin que ce dernier ne soit pas un facteur limitant. L'échantillon à doser est donc dilué dans une quantité d'eau, telle qu'à l'issue de la mesure le taux d'oxygène résiduel reste supérieur à 50 % du taux initial. Deux mesures parallèles sont donc nécessaires, l'une mesurant l'oxygène dissous de l'échantillon, et l'autre mesurant l'oxygène dissous de l'eau ayant servi à diluer l'échantillon. La DBO réelle est obtenue par soustraction de la différence d'oxygène de l'eau de dilution à celle de l'échantillon. La figure 1.1 présente schématiquement le principe de cette dilution, et l'équation permettant de remonter à la DBO. Les mesures sont effectuées à une température de 20°C et à l'obscurité afin d'éviter toute photosynthèse parasite.

1.1. La Demande Biologique en Oxygène (DBO₅) : un paramètre important

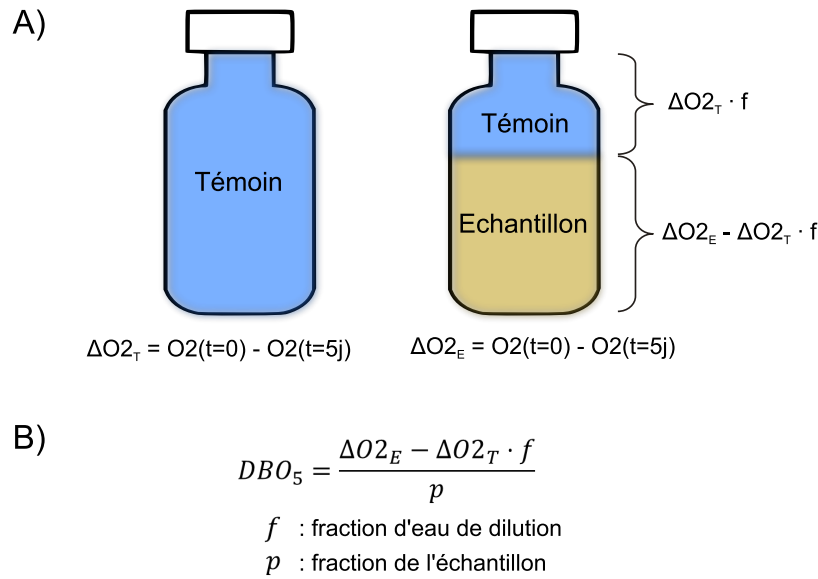


FIGURE 1.1 – Schéma expliquant le principe de dilution (A) et le calcul de la DBO (B) en fiole fermée

La réglementation actuellement en vigueur, en France, impose des niveaux limites de rejet des installations de 30 mg/l de Matières En Suspension (MES) et 35 mg/l de DBO₅.

1.1.2 Méthodes standards et outils pour la mesure de la DBO₅

La mesure de la DBO est traditionnellement effectuée selon une méthode normalisée actuellement nommée « *essai en fiole fermée* », décrite dans les normes internationales ISO 5815-1 : 2003 et ISO 5815-2 : 2003 intitulées « *Qualité de l'eau — Détermination de la demande biochimique en oxygène après n jours (DBO_n)* ». La première partie de la norme concerne la mesure de la DBO par la méthode de dilution (« *Partie 1 : Méthode par dilution et ensemencement avec apport d'allylthiourée* »), tandis que la seconde concerne la mesure des eaux non-diluées (« *Partie 2 : Méthode pour échantillons non dilués* »). Pour imiter la diversité microbienne présente dans l'environnement, ces tests sont basés sur des échantillons microbiens généralement prélevés dans l'environnement (diversité microbienne inconnue, densité cellulaire $\approx 10^5$ cellules/ml) [OCDE,].

Le protocole indiqué dans ces normes consiste à mettre les échantillons potentiellement contaminés par des matières organiques dans des bouteilles (Figure 1.2(a)), à les aérer afin de saturer l'échantillon en oxygène, puis à les ensemencer avec une population bactérienne. Les flacons sont alors fermés hermétiquement et mis en incubation dans une chambre noire à 20°C. L'oxygène dissous est mesuré, pour tous les échantillons, avant et après incubation de n jours pour estimer la DBO. Les normes précisent que la mesure de l'oxygène doit être effectuée soit par la méthode iodométrique (Winkler's method) (ISO 5813 :1983 *Qualité de l'eau - Dosage de l'oxygène dissous - Méthode iodométrique*) [James H., 1965] soit par la méthode de la sonde électrochimique (ISO 5814 :2012 *Qualité de l'eau -*

Chapitre 1. Contexte et positionnement de l'étude

Dosage de l'oxygène dissous - Méthode électrochimique à la sonde).

Une version commercialisée semi-automatique est disponible [WTW,] (Figure 1.2(b)). Une sonde électrochimique est insérée dans le flacon, de manière hermétique, pour mesurer la concentration en oxygène dissous dans l'échantillon en temps réel. Cette amélioration technique permet de mesurer la cinétique de dégradation de la matière organique dans les conditions d'analyse imposées par la norme. Des versions automatisées existent sur le marché, un exemple de ce type de système est présenté sur la figure 1.2(c) [Skalar,]. Leur protocole suit les spécifications de la méthode standard, mais les étapes manuelles sont remplacées par un bras robotisé. Ces systèmes sont capables d'effectuer les dilutions nécessaires, de mélanger l'échantillon, et même d'ajouter l'inoculum bactérien.

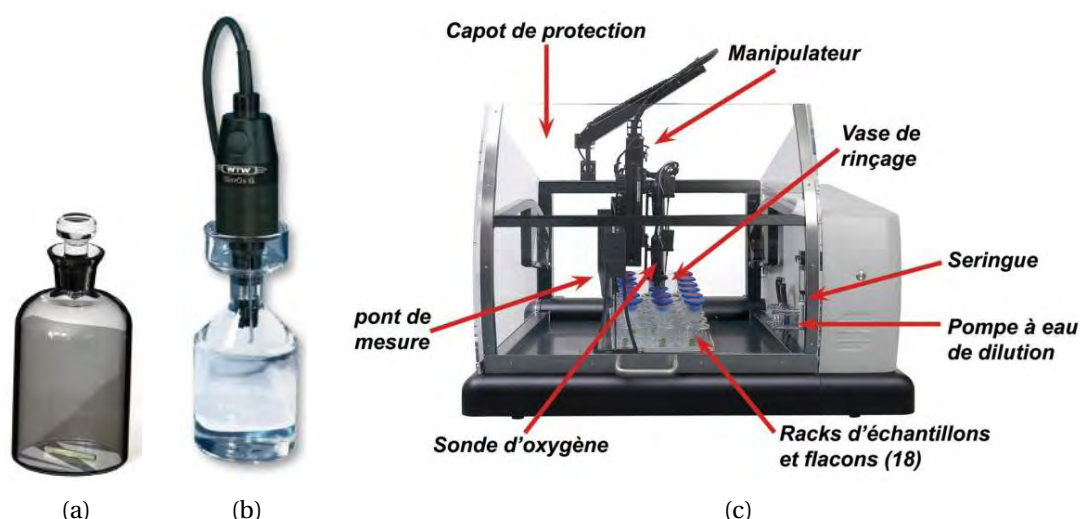


FIGURE 1.2 – Système de mesure de la DBO : essai en fiole fermée (a) manuellement, (b) semi-automatique et (c) automatique.

Il existe, classiquement, deux méthodes de mesure de l'oxygène dissous. La première, la méthode de Winkler, est une méthode de dosage en retour, par iodométrie, du dioxygène dissous en solution aqueuse. Le principe de cette méthode consiste à fixer l'oxygène dissous en ajoutant du chlorure de manganèse (MnCl_2) dans l'eau, il se forme alors un précipité d'hydroxyde de manganèse ($\text{Mn}(\text{OH})_3$). Puis par l'ajout du réactif de Winkler (KI KOH), de l'iode est libérée en quantité proportionnelle à celle de l'oxygène dissous. Finalement, on dose l'iode grâce à du thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Cette méthode permet d'obtenir une valeur précise de la concentration en oxygène, mais le nombre d'opérations et de réactifs nécessaires à sa réalisation sont importants.

La seconde, la méthode électrochimique, consiste à utiliser un capteur d'oxygène électrochimique (par exemple : électrode de Clark) pour fournir une grandeur électrique mesurable proportionnelle à la concentration en oxygène dissous. Cette méthode est bien plus simple à mettre en œuvre que la méthode de Winkler, mais elle est souvent plus imprécise.

1.2 Les bactéries : un outil pour l'évaluation de la qualité de l'eau

Afin de comprendre comment les bactéries peuvent nous permettre d'évaluer avec précision la qualité de l'eau, il faut d'abord comprendre leur mode de vie et de croissance. Nous verrons, en premier lieu, la composition d'une bactérie. Ensuite, nous aborderons l'étude de leur phase de croissance et nous verrons qu'il est possible de les modéliser sous forme d'équations. Finalement, nous passerons en revue les stratégies adoptées pour sélectionner les souches bactériennes particulières en vue de déterminer la qualité d'une eau.

1.2.1 Description des bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires sans noyau, donc des procaryotes. Leur rôle pour l'environnement et les êtres vivants est multiple, leurs actions pouvant être positives ou négatives. Ces minuscules organismes, de quelques micromètres de longueur, sont les premiers êtres vivants à être apparus sur Terre, il y a environ 3,5 milliards d'années [Guespin-Michel, 2012]. Le mot bactérie est dérivé d'un mot grec signifiant « bâtonnet » et est cité pour la première fois en 1838 par Ehrenberg. Au XIXe siècle, les travaux de Louis Pasteur ont révolutionné la bactériologie. On lui doit la découverte du rôle infectieux de certains micro-organismes, mais également la conception des milieux de culture, des procédés de destruction des micro-organismes comme l'autoclave et la pasteurisation. Depuis, les connaissances sur les micro-organismes, et notamment sur les bactéries, n'ont cessé de croître, avec les travaux de grands scientifiques tels que Robert Koch et Paul Ehrlich (respectivement prix Nobel 1905 et 1908) [Wikipedia,].

Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes, Gram négatif ou Gram positif, selon la structure et la composition chimique de leur paroi cellulaire. Dans ces groupes, les bactéries peuvent être classifiées selon leur forme. Nous retrouvons principalement les cocci (ou coques) de forme sphérique ou ovale (staphylocoque, streptocoque, pneumocoque...) et les bacilles de forme allongé (en bâtonnets) (Escherichia Coli, Pseudomonas, Listeria...). Mais il existe bien d'autres formes encore, en bâtonnet incurvé (Vibrio), des hélicoïdales, en tire-bouchon, en massue... La grande diversité des formes est déterminée par la paroi cellulaire et le cytosquelette. Cependant, elles ont toute une même structure de base schématisée en figure 1.3.

Leur structure est composée de [Dehecq and Duhamel, , iMedecin.com,] :

- La paroi cellulaire est une enveloppe rigide plus ou moins épaisse présente chez toutes les bactéries. Elle constitue le squelette externe et est responsable de la forme de celle-ci. La bactérie étant très riche en solutés, sa pression osmotique interne est très élevée. La paroi évite donc l'éclatement de la cellule.
- La capsule est une substance visqueuse, plus ou moins épaisse qui entoure la paroi. Elle joue un rôle de protection de la cellule contre l'environnement externe et aussi contre la phagocytose.

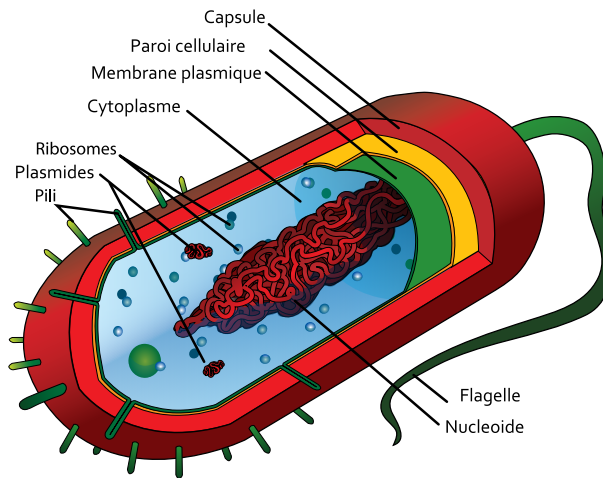


FIGURE 1.3 – Schéma de la structure cellulaire d'une cellule bactérienne typique.

Elle peut être responsable de l'adhésion aux surfaces (donc de la formation de biofilms).

- Les flagelles sont des filaments longs et très fins servant au déplacement de plusieurs espèces de bactéries. Les bactéries hétérotrophes peuvent utiliser leurs flagelles pour se diriger vers des zones riches en nutriments grâce au phénomène de chimiotactisme. Le nombre et la position des flagelles constituent un critère de classification des bactéries à flagelles.
- Les pili sont des filaments relativement courts se situant à la surface de la paroi de nombreuses bactéries à Gram négatif. On les classe en deux catégories : les pili communs qui permettent l'adhésion sur un substrat, et les pili sexuels servant à la transmission de plasmides codant des informations génétiques d'une bactérie mère à une bactérie fille (phénomène de conjugaison).
- L'appareil nucléaire (ou Nucléotide) est une région située à l'intérieur des bactéries dans laquelle se trouve le matériel génétique qui est formé, le plus souvent, d'un seul chromosome en forme d'anneau.
- Les ribosomes sont de très fines granulations servant à la synthèse des protéines bactériennes. Ils se trouvent dans le cytoplasme et sont particulièrement présents à proximité de la membrane cytoplasmique.
- Le cytoplasme désigne le contenu d'une cellule, il est délimité par la membrane plasmique. Il contient des ribosomes, des plasmides et le chromosome. L'ensemble des constituants cytoplasmiques sont placés dans un gel colloïdal, qui contient 80 % d'eau et des substances organiques et minérales de réserves, à une pression interne considérable (5 à 20 atmosphères).
- Les plasmides sont des molécules d'ADN qui se répliquent indépendamment du chromosome, qui peuvent s'intégrer à celui-ci et qui sont transmissibles. Les bactéries en comportent généralement 5 à 30 copies, mais ils ne sont pas essentiels à la survie de la bactérie. Ils sont porteurs de caractères de fertilité, de résistance aux antibiotiques ou aux antiseptiques, de bactériocines, de virulence, de caractères métaboliques, entre autres.
- La membrane plasmique est une structure interne à l'interface entre le cytoplasme et les struc-

1.2. Les bactéries : un outil pour l'évaluation de la qualité de l'eau

tures externes. Cette membrane à un rôle métabolique majeur, elle assure : une perméabilité sélective et le transport des substances solubles vers l'intérieur de la bactérie, une fonction respiratoire par transport d'électrons et de phosphorylation oxydative pour les bactéries aérobies, et d'excrétion d'enzymes hydrolytiques qui dégradent les polymères en sous-unités suffisamment petites pour pouvoir traverser la membrane plasmique et être importés dans la bactérie.

Comme tout être vivant, les bactéries ont besoin de nutriments pour croître et se reproduire, à partir de substances organiques simples (acides aminés, glucides, acides gras, vitamines, hydrocarbures, etc.) et de certaines substances inorganiques (phosphates, soufre, nitrates, etc.). La croissance bactérienne correspond à l'accroissement du nombre de bactéries et non à l'augmentation de la taille d'une bactérie. La croissance fonctionne sur le principe de la division cellulaire (scissiparité) et est influencée par différentes conditions physico-chimiques du milieu.

Les facteurs qui influencent le plus cette croissance sont la température [Davey, 1994, Pietikainen et al., 2005], l'humidité [Zuberer and Kenerley, 1993], l'oxygène et le pH [Davey, 1994]. Dans un milieu propice, les bactéries peuvent se multiplier très rapidement. Une population de bactéries peut doubler toutes les 20 minutes en fonction de la disponibilité en nutriments [Seto and Alexander, 1985], la présence de bactéries concurrentes, ou encore de la présence de prédateurs, de bactériophages ou d'antibiotiques [Rolinson, 1980]. Les bactéries se divisent, et leur nombre augmente dans le temps. Si on relève le nombre de bactéries à différents moments au cours de la croissance, en milieu de culture liquide non renouvelé, nous obtenons une courbe de croissance et observons différentes phases. En 1918, Buchanan décomposa la croissance bactérienne en sept phases [Buchanan, 1918] représentées en échelle semi-logarithmique en figure 1.4.

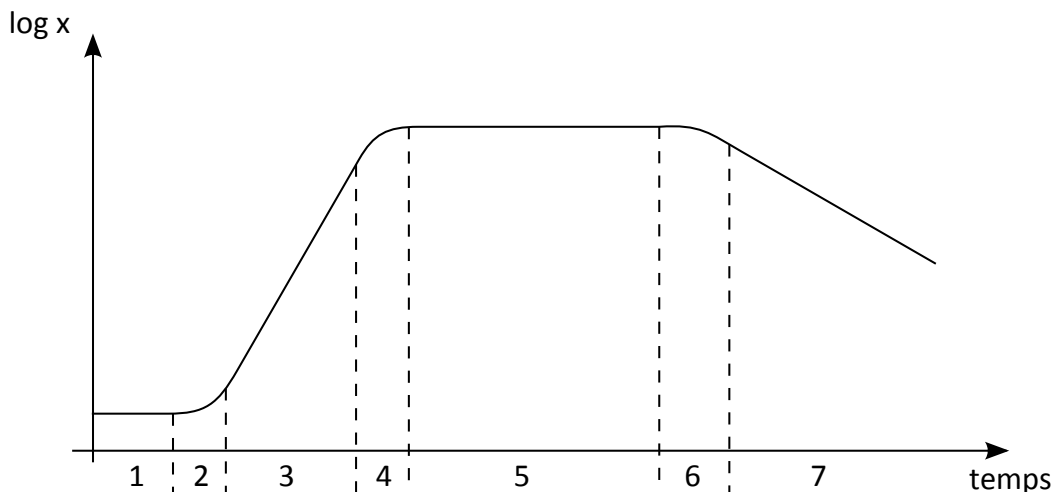


FIGURE 1.4 – Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases en fonction du temps. x représente la densité ou la biomasse de la culture.

1. La phase de latence correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et

un état de croissance à proprement parlé. Il s'agit d'une phase d'adaptation au nouvel environnement. Cette phase dépend soit de l'âge de l'inoculum, soit d'une adaptation enzymatique.

2. La phase d'accélération commence à partir de l'adaptation effective des bactéries à leurs nouvelles conditions de culture. Durant cette période, la valeur du taux spécifique de croissance augmente, jusqu'à atteindre sa valeur maximale.
3. La phase de croissance maximale ou exponentielle. Lorsque les concentrations microbiennes sont exprimées en coordonnées semi-logarithmiques en fonction du temps, la pente de la droite correspond au taux spécifique maximal de croissance.
4. La phase de décélération ou phase de freinage. Elle intervient au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que des produits toxiques s'accumulent. La population continue à croître mais le temps de génération augmente.
5. La phase stationnaire. Au cours de cette phase, la population microbienne n'évolue plus, le taux de croissance est nul, donc la population demeure stationnaire. Il y a un équilibre entre le nombre de nouvelles cellules et le nombre de cellules qui meurent. Cette phase peut durer plusieurs heures et même plusieurs jours.
6. La phase de début de décroissance. Pendant cette phase, le nombre de bactéries diminue, d'abord lentement puis avec une rapidité croissante, jusqu'à l'établissement d'un taux de mortalité logarithmique maximal.
7. La phase de décroissance exponentielle de la population. Cette phase apparaît lorsque le milieu devient fortement défavorable à la multiplication des micro-organismes et entraîne leur mort rapide.

Le domaine de la microbiologie prévisionnelle tente de décrire théoriquement les croissances de populations microbiennes afin de prévoir le comportement d'une population sous certaines conditions expérimentales. Bien que la forme de la cinétique observée soit simple, la construction d'un modèle décrivant la globalité de la cinétique de croissance n'est pas chose aisée. De nombreux modèles primaires ont été développés pour représenter les croissances de populations microbiennes, tels que : le modèle exponentiel et le modèle logistique que nous allons présenter ci-après.

1.2.2 Modélisation de la croissance bactérienne

Whiting et Buchanan, en 1993, ont proposé trois classes de modèles : les modèles primaires, secondaires et tertiaires [Whiting and Buchanan, 1993].

Les modèles primaires décrivent l'évolution au cours du temps de la population bactérienne dans un environnement spécifique. Selon leurs complexités, les modèles primaires sont caractérisés par un ou plusieurs paramètres comme le temps de latence, le taux de croissance, la densité maximale, etc. Ces paramètres sont spécifiques à des conditions environnementales constantes au cours du temps.

1.2. Les bactéries : un outil pour l'évaluation de la qualité de l'eau

Les modèles secondaires permettent de décrire l'influence des facteurs environnementaux sur un ou plusieurs paramètres du modèle primaire.

Les modèles tertiaires utilisent des systèmes experts et des bases de données pour faire le lien entre les modèles primaires et les modèles secondaires. Un système expert est un logiciel capable de répondre à des questions, en effectuant une relation à partir de faits (base de données) et de règles connues (modèles primaires et secondaires).

1.2.2.1 Modèle exponentiel

Le modèle exponentiel est le modèle primaire le plus simple qui soit, il décrit la phase exponentielle de la croissance bactérienne où les bactéries sont à leur vitesse de croissance maximale. La population bactérienne double tous les temps T_G (Temps de Génération), si la population bactérienne initiale de l'inoculum est x_0 , on peut alors écrire que la population bactérienne x à l'instant t est :

$$x = x_0 \cdot 2^{\frac{t}{T_G}} \quad (1.2)$$

On peut également estimer le taux de croissance exponentiel μ en écrivant l'équation 1.2 sous sa forme exponentielle :

$$x = x_0 \cdot e^{\mu t} \quad (1.3)$$

Nous en déduisons alors la relation suivante entre le taux de croissance exponentiel et le temps de génération : $\mu = \ln(2) / T_G$.

Bien que la compréhension du mécanisme de croissance bactérienne soit relativement récente (XIX^e siècle), l'équation 1.3 est identique au modèle de Malthus, décrit en 1798 dans son essai intitulé « *An essay on the principle of population* ». Il essaya de décrire le rapport entre l'accroissement de la population humaine et celui de la nourriture. Il suppose que la variation de densité de population est décrite par l'équation différentielle linéaire suivante :

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \quad (1.4)$$

En supposant la condition initiale $x(0) = x_0$, la solution de l'équation différentielle est l'équation 1.3. Son modèle ajuste bien la phase exponentielle, mais il est mal adapté pour décrire les croissances que nous observons dans la nature et qui sont généralement limitées. En effet, ce modèle est correct tant que la nourriture est suffisamment abondante. Pourtant nous comprenons bien, dans le cas d'une culture en milieu non renouvelé, que les ressources vont venir à manquer et la population ne pourra pas croître indéfiniment. C'est pourquoi, les théoriciens ont rapidement cherché à modifier ce modèle

Chapitre 1. Contexte et positionnement de l'étude

de façon à freiner sa croissance lorsque la population augmente. L'idée est de remplacer la constante μ par une fonction $\mu(x)$ qui décroît quand x augmente et qui finit par devenir négative. La population a un taux de croissance de moins en moins fort au fur et à mesure qu'elle croît (les bactéries ont de plus en plus de mal à se reproduire), au point de devenir négatif (pour une population trop abondante les cellules commencent à mourir). Plusieurs auteurs ont travaillé sur ce sujet, tels que Verhulst ou Gompertz, souvent avec des hypothèses différentes sur la fonction $\mu(x)$.

1.2.2.2 Modèle Logistique

En 1838, afin de modéliser la dynamique de croissance d'une population dans un environnement aux ressources limitées, Verhulst propose une équation différentielle qu'il baptise "équation logistique" [Verhulst, 1938] :

$$\frac{dx}{dt} = \mu \left(1 - \frac{x}{K}\right) x \quad (1.5)$$

Où K est un facteur lié à la quantité de ressources. Il correspond à la population bactérienne maximale obtenue en fin de croissance, lors de la phase stationnaire. Et μ représente le taux de croissance spécifique de la population.

L'équation 1.5 est basée sur l'hypothèse que le taux de croissance à l'instant t d'une population donnée est proportionnel à la taille de la population à cet instant t et aux ressources restantes qui sont toujours disponibles. A ce jour, les applications de cette loi sont généralisées, et couvrent à la fois les descriptions de croissance de cellules, d'organes ou d'organismes.

Pour une condition initiale $x(0) = x_0$, la solution est donnée par :

$$x = K \frac{1}{1 + \left(\frac{K}{x_0} - 1\right) e^{-\mu t}} \quad (1.6)$$

Le modèle qui en résulte simule la vitesse de croissance de la population bactérienne par des équations faisant intervenir uniquement le temps et la concentration en biomasse. Il en résulte que le taux de croissance spécifique diminue linéairement avec l'augmentation de la concentration de la biomasse.

1.2.2.3 Modèles avec temps de latence

Les différents modèles que l'on peut retrouver dans la littérature ne prennent pas en compte la phase de latence (phase 1 sur la figure 1.4). Des auteurs, tels que Zamora et Zaritzky ou Kono, se sont penchés sur ce problème, ils ont supposé une absence de croissance de la population durant la phase de latence

1.2. Les bactéries : un outil pour l'évaluation de la qualité de l'eau

et durant la transition entre celle-ci et la phase de croissance exponentielle (rupture). Ainsi, on peut adapter les modèles exponentiel et logistique pour faire apparaître le temps de latence λ .

Zamora et Zaritzky ont proposé, en 1985, le modèle exponentiel avec temps de latence [Zamora and Zaritzky, 1985] :

$$x = \begin{cases} x_0 & \text{si } t \leq \lambda \\ x_0 e^{\mu(t-\lambda)} & \text{si } t \geq \lambda \end{cases} \quad (1.7)$$

Kono, en 1968, a proposé le modèle logistique avec temps de latence [Kono, 1968] :

$$x = \begin{cases} x_0 & \text{si } t \leq \lambda \\ K \frac{1}{1 + \left(\frac{K}{x_0} - 1 \right) e^{-\mu(t-\lambda)}} & \text{si } t \geq \lambda \end{cases} \quad (1.8)$$

En réalité, pour donner au modèle utilisé une description de la phase de latence, il suffit de remplacer le temps t par $t - \lambda$.

Ces modèles seront appliqués sur des données expérimentales que nous avons obtenues et seront représentés et commentés dans le chapitre 4 de ce manuscrit.

1.2.3 Les bactéries dédiées à la mesure de la DBO

Généralement, l'inoculum microbien utilisé pour la mesure de la DBO est soit issu des populations microbiennes de l'environnement (comme dans la méthode normalisée), soit il s'agit d'une souche pure. L'inoculum provenant de l'environnement est capable de dégrader un large panel de composés organiques [Liu et al., 2000]. Cependant, sa composition reste inconnue et peut compromettre la reproductibilité de la mesure de la DBO [Blok and Booy, 1984, Thouand et al., 1995, Thouand et al., 1996]. En revanche, l'utilisation d'une seule souche microbienne améliore la reproductibilité de la mesure, mais diminue le panel de composés organiques dégradables. Certains auteurs ont proposé de résoudre ce problème en utilisant un mélange de deux à quatre souches microbiennes spécifiquement choisies [Catterall et al., 2003, Jia et al., 2003, Jiang et al., 2006] pour obtenir un capteur combinant une bonne reproductibilité et un grand potentiel de biodégradation. Cependant, ces mélanges multi-espèces sont difficiles à contrôler sur le long terme, car les différentes souches bactériennes vont rentrer en concurrence pour consommer le carbone organique.

Le choix des bactéries utilisées pour caractériser un effluent est une étape cruciale. En effet, les tests actuels utilisent un inoculum bactérien issu de boues activées, ce qui conduit à une variabilité de l'ordre de 20% dans les mesures (voir paragraphe 1.3.7 de ce chapitre).

Chapitre 1. Contexte et positionnement de l'étude

Dans le but de diminuer cette variabilité, les bactéries doivent être sélectionnées avec attention. Le GEPEA, partenaire de ce projet, a effectué des études visant à déterminer un panel de souches pertinentes pour l'évaluation de la biodégradabilité.

Leur stratégie a été d'effectuer, en premier lieu, une étude portant sur la structure et la composition des boues activées généralement retrouvées dans les stations d'épuration afin d'établir une première liste de souches potentiellement intéressantes. Ils se sont basés sur une publication décrivant avec précision la composition des boues activées [Xia et al., 2010]. En s'appuyant sur cette étude, ils ont pu établir une matrice de calcul permettant de reconstituer un consortium bactérien artificiel limité et respectueux des ratios des groupes de bactéries présentes dans les boues de stations d'épuration. Ainsi, pour mimer correctement la diversité bactérienne présente dans une boue activée, un consortium artificiel de 20 souches bactériennes devrait être composé d'une souche du groupe des *rhodobacterales*, une des *rhizobiales*, une des *bradyrhizobiales*, une des *sphingomonadales*, deux des *burkholderiales*, une des *rhodocyclales*, une des *desulfobacterales*, une des *helicobacteraceae*, deux des *enterobacterales*, une des *alteromonadales*, une des *pseudomonadales*, trois des *firmicutes*, deux des *actinobacteria* et enfin deux des *bacteroidetes*.

A partir de là, ils se sont intéressés plus particulièrement au choix des souches bactériennes dans chacun des groupes observés. Pour cela, ils ont utilisé plusieurs sources d'informations, telles que les collections de souches de Pasteur, DSMZ ou ATCC, ou encore la base de données sur la biodégradation de l'Université du Minnesota. Les souches bactériennes ont été choisies selon plusieurs critères, à savoir : les souches choisies devaient être facilement cultivables (des souches préférentiellement aérobies), non pathogènes et préférentiellement isolées à partir de boues activées. Sur ces critères de sélection et selon les groupes bactériens identifiés dans les boues activées, un panel de 30 souches bactériennes a ainsi pu être mis en avant. Certains groupes ne répondant pas à ces critères ne sont pas présents dans la liste, par exemple : le groupe des *desulfobacterales*, *desulfovibrionales*, *bacteriodetes* sont des anaérobies strictes, le groupe des *helicobacteraceae* est pathogène, et les *alteromonadales* sont des souches marines, elles nécessitent donc une culture spécifique.

Chacune de ces 30 souches ont été testées, au travers des microplaques BIOLOG GEN III, afin d'évaluer leur capacité de dégradation. Ces microplaques permettent de caractériser les microorganismes à l'aide de 94 tests phénotypiques : 71 tests de dégradation de source de carbone et 23 essais de sensibilité toxicologique. Cette approche a permis d'établir des empreintes de biodégradation propres à chacune des souches bactériennes. En les classant hiérarchiquement et de manière ascendante, cela a permis de mettre en évidence des similitudes entre les profils. Ainsi, les bactéries dont le profil de biodégradation sont les plus semblables seront regroupées ensemble, et plus nous remonterons dans la hiérarchie de la classification, plus les profils seront dissimilaires. Une fois la classification effectuée, ils ont mené une étude pour répondre à la question : à partir de quel seuil de dissimilarité peut-on considérer que les profils métaboliques sont significativement différents ? Cette étape a permis de faire ressortir 10 groupes de profils de biodégradation. Sur chacune des bactéries de chaque groupe de biodégradation,

1.2. Les bactéries : un outil pour l'évaluation de la qualité de l'eau

des tests de rapidité de croissance et de résistance toxicologique ont été effectués. Ceci pour extraire un représentant bactérien hétérotrophe de chaque groupe afin de former un consortium artificiel pertinent de la faune microbienne des boues activées.

En supplément de ces 10 souches, viennent s'ajouter 5 autres souches bactériennes naturellement bioluminescentes. Ces souches ont été intégrées dans la stratégie de mesure afin de rendre compte de l'impact toxicologique des polluants présents sur la consommation d'oxygène par les bactéries hétérotrophes. Ce panel de souche permettra donc de déterminer la présence des principales substances prioritaires définies par l'Union Européenne dans le cadre de la police de l'eau (N° 2455/2001/EC).

1.2.4 L'évaluation de la toxicité : bactéries ou algues ?

La mesure de la toxicité est un aspect très important dans le suivi de la qualité des eaux rejetées dans l'environnement. En effet, certaines substances chimiques peuvent causer des problèmes de santé et de graves dégâts environnementaux. De nombreux produits chimiques peuvent s'accumuler dans le corps humain, dont un grand nombre d'entre eux sont capables de provoquer des tumeurs cancéreuses, des malformations de naissances ou de perturber le développement du système endocrinien. Des recherches ont alors menées au développement de biocapteurs, à base de bactéries bioluminescentes ou de microalgues dédiées à la mesure de la toxicité.

Les microalgues photosynthétiques sont utilisées dans l'industrie des biocapteurs car ils sont capables de fournir des informations sur les niveaux de pollution, basées sur des modifications de l'activité photosynthétique ou métabolique [Kasai and Hatakeyama, 1993, Lagarde and Jaffrezic-Renault, 2011]. Le suivi des molécules nécessaires à la photosynthèse et au métabolisme des algues (telles que l'oxygène, le peroxyde d'hydrogène...) ainsi que le pH peuvent indiquer la présence d'herbicides. Par exemple, les capteurs ampérométriques à base de microalgues sont conçus pour surveiller la production photosynthétique d'oxygène et peuvent donc indiquer une pollution liée à l'inhibition de leur activité photosynthétique [Pandard and Rawson, 1993]. De plus, des stress exercés sur les algues, comme des agents pathogènes, des métaux lourds, des polluants, le sel, la lumière ou encore des températures extrêmes, modifient la concentration en peroxyde d'hydrogène et peut donc être un indicateur de toxicité [Mittler, 2002]. La surveillance du pH peut également fournir des informations sur les modifications de l'activité métabolique induites par les herbicides et autres inhibiteurs basés sur les changements du taux de basification et d'acidification du milieu [Schubnell et al., 1999]. Une équipe du laboratoire a développé un biocapteur à trois électrodes intégrées sur un substrat silicium capable de mesurer les trois espèces : oxygène, peroxyde d'hydrogène et pH [Tsopela et al., 2014]. La concentration de ces espèces est mesurée par méthode ampérométrique et potentiométrique. La sensibilité au peroxyde d'hydrogène et à l'oxygène de leur électrode en platine noir est de $17 \text{ pA} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{nM}^{-1}$ avec une limite de détection de 10 nM. L'électrode en platine/oxyde d'iridium (Pt/IrO_2) permet de mesurer le pH avec une sensibilité de 60 mV/pH sur une gamme de pH de 2,0 à 12,0.

Chapitre 1. Contexte et positionnement de l'étude

Par ailleurs, l'activité photosynthétique des microalgues est régie par leur chloroplaste (organite contenant de la chlorophylle), il permet de capter l'énergie lumineuse nécessaire à la photosynthèse. La chlorophylle, alors à l'état excité, retombe à l'état stable par émission soit de chaleur, soit de fluorescence. Les agents toxiques modifient l'activité photosynthétique ou métabolique des microalgues, et donc de la fluorescence. Lefèvre et al. [Lefevre et al., 2012] ont développé un biocapteur microfluidique à base de microalgues pour la détection de polluants dans l'eau. La puce se compose premièrement d'un réseau de canaux fluidiques et de réservoirs contenant l'échantillon et les microalgues, deuxièmement de LED Organique (OLED) permettant d'exciter les microalgues, et troisièmement de Photodiode Organique (OPD) pour mesurer la fluorescence émise (Figure 1.5). Ce biocapteur a été testé avec différentes concentration en Diuron (pesticide). Ils ont déterminé une sensibilité de détection de 7,5 nM de Diuron. La plus forte concentration testée est de 1,5 μ M.

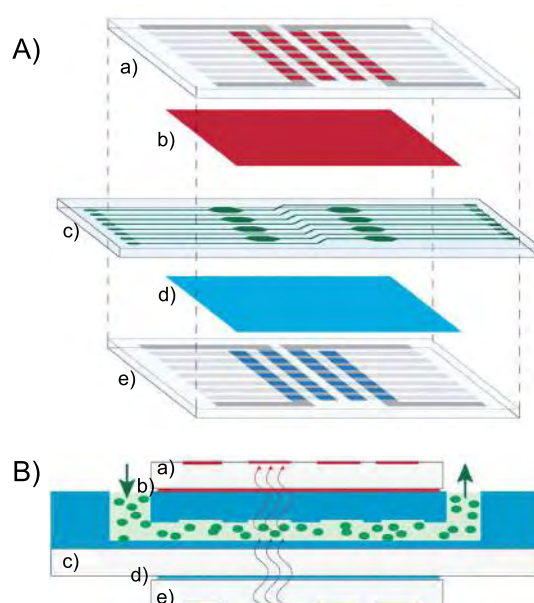


FIGURE 1.5 – Biocapteur développé par Lefèvre et al. [Lefevre et al., 2012] A) Vue éclatée et B) vue en coupe : la puce microfluidique (c) est prise en sandwich entre les OLED (e) et les OPD (a). Le filtre d'excitation (d) est entre la puce microfluidique et les OLED, tandis que le filtre d'émission (b) est entre la puce microfluidique et les OPD.

Pour ce qui est des bactéries, la grande majorité des publications recensées utilisent des bactéries bioluminescentes recombinées [Gu et al., 2002, Choi and Gu, 2002, Kelly et al., 1999, Ren and Frymier, 2002, Gil et al., 2000] pour la mesure de la toxicité. Certaines, bien moins nombreuses, utilisent une souche pure naturellement bioluminescente, *Aliivibrio fischeri* [Jennings et al., 2001, Hsieh et al., 2004].

La bioluminescence est la production et l'émission de lumière, dite froide, car moins de 20 % de la lumière génère de la chaleur. Ce phénomène est lié à une fonction organique de certains êtres vivants, résultant d'une réaction chimique au cours de laquelle l'énergie chimique est convertie en énergie lumineuse. Le mécanisme général des réactions bioluminescentes résulte de la combinaison de la

1.3. Les avancées dans le domaine de la DBO : état de l'art

luciférase (une enzyme) avec la luciférine (son substrat), le retour à l'état stable de cette réaction génère l'émission d'un photon. Les agents toxiques peuvent intervenir dans de nombreux mécanismes du métabolisme bactérien [Cronin and Schultz, 1998]. Par exemple, la toxicité peut impliquer des interactions avec des récepteurs de surface, perturber la fonction de la membrane cellulaire, avoir des réactions chimiques avec les composants cellulaires, inhiber ou concurrencer le système enzymatique [Sixt et al., 1995, Gustavson et al., 1998].

Le suivi de la bioluminescence peut être un bon indicateur de la toxicité de l'eau. En effet, l'altération de l'un des mécanismes du métabolisme bactérien induit une perturbation de l'émission de la bioluminescence. Dans le cas de bactéries recombinées, deux souches bactériennes sont généralement utilisées : une souche génétiquement modifiée, SHK 1, dont la souche d'origine est un *Pseudomonas* isolé à partir de boues activées d'une usine de traitement des eaux usées industrielles, ou bien une souche *E. Coli* dans laquelle l'opéron *luxCDABE* codant l'émission de lumière est introduit. Kelly et al. [Kelly et al., 1999], en 1999, ont observé une diminution de la bioluminescence lorsque la souche SHK 1 a été exposée à des substances toxiques telles que le cadmium (0,01 à 10 000 mg/l), le 2,4-dinitrophénol (0,01 à 1 000 mg/l), et l'hydroquinone (0,01 à 10 000 mg/l). La diminution de la bioluminescence observée était plus importante avec l'augmentation de la concentration de produit toxique. A l'aide de cette souche, Ren et Frymier [Ren and Frymier, 2002] ont étendu l'étude de la toxicologie en déterminant la concentration efficace à 50% (CE50), qui est la concentration d'une substance toxique nécessaire pour réduire l'émission de bioluminescence de 50%, de 98 produits chimiques organiques. Les gènes codant l'émission de lumière dans les bactéries recombinées sont généralement issus d'une souche marine naturellement bioluminescente, *Aliivibrio fischeri*. Certains chercheurs [Jennings et al., 2001, Hsieh et al., 2004] ont utilisé directement ces souches et ont ainsi montré leur utilité dans la mesure de la toxicité de l'eau. Suite à ces travaux, un test prêt à l'emploi a été commercialisé, le test Microtox, qui reste de nos jours très largement utilisé.

L'émission de la bioluminescence de ces bactéries ne nécessite pas d'excitation lumineuse externe. La mesure de la diminution de cette bioluminescence naturelle peut s'effectuer à l'aide d'un détecteur optique de grande sensibilité car l'intensité de bioluminescence émise est très faible.

1.3 Les avancées dans le domaine de la DBO : état de l'art

Dans cette partie, nous allons présenter les systèmes actuels pour évaluer la DBO selon les méthodes standards. Nous recenserons, également, les avancées menées jusqu'à présent portant sur la technologie des capteurs ou sur les procédés d'évaluation. Finalement, nous apporterons un regard critique à cette étude bibliographique.

1.3.1 Les méthodes standards modifiées

Les améliorations des biocapteurs fonctionnant sur le principe des méthodes standards sont basées principalement sur la simplification de ces méthodes (par exemple, une diminution de l'entretien, une réduction de l'espace de travail ou une augmentation de la plage de mesure de la charge organique). Cependant, ces méthodes utilisent la même diversité bactérienne et le même temps de mesure (5 jours) que les méthodes standards. Par conséquent, elles présentent les mêmes limites pour le suivi en temps réel de la DBO dans l'environnement.

L'une des principales innovations concerne l'élément le plus important du système, c'est-à-dire le capteur d'oxygène. Son fonctionnement et sa technologie de fabrication sont totalement différents de ceux des sondes utilisées jusque-là (sondes électrochimiques soit iodométriques).

En effet, fabriqué à partir d'un composé chimique fluorescent qui réagit avec l'oxygène, son mode de fonctionnement est basé sur des interactions optiques, d'où son appellation 'optode'. Comme le montre la figure 1.6, l'intensité de fluorescence, faisant suite à une excitation lumineuse, est proportionnelle à la concentration en oxygène dissous présent dans l'échantillon [Choi and Xiao, 1999].

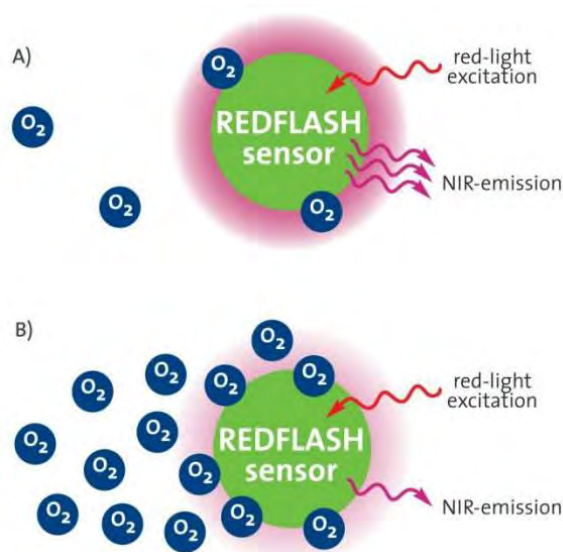


FIGURE 1.6 – Principe de fonctionnement d'une optode. Moins l'eau contient d'oxygène plus l'optode fluoresce (A), et inversement plus l'eau contient d'oxygène moins l'optode fluoresce (B) [PyroScience,].

Les avantages de ce capteur sont qu'il nécessite peu d'entretien et qu'il ne consomme pas l'oxygène durant la mesure. Cependant l'espace de travail nécessaire à la réalisation de la mesure reste identique au test normalisé.

Les sociétés Hach Lange (LCK 554 and LCK 555) et Macherey Nagel (BOD5 Nanocolor) proposent des cuvettes tests afin de réduire l'espace de travail nécessaire pour effectuer un test de DBO. Ces

1.3. Les avancées dans le domaine de la DBO : état de l'art

tests suivent le même protocole que la méthode standard (une incubation à 20 °C en chambre noire, dilution de l'échantillon si la charge organique est trop élevée et temps de mesure de 5 jours) et sont basés sur la consommation de l'oxygène dissous par les microorganismes. L'oxygène dissous est mesuré avant et après la période d'analyse directement dans la cuvette. Dans le test Hach Lange, plusieurs réactifs sont ajoutés à l'échantillon, au moment de l'évaluation de la teneur en oxygène, qui vont former un colorant rouge après réaction avec l'oxygène dissous. La quantité de colorant est proportionnelle à la concentration d'oxygène, la mesure de celui-ci par photométrie permet l'estimation de la consommation d'oxygène et, par conséquent, de la DBO. La mesure de l'oxygène dissous dans le test Macherey Nagel repose sur la méthode Winkler (la méthode standard).

Cadwell et Langelier [Caldwell and Langelier, 1948] ont développé une méthode se basant sur la mesure de la chute de pression à l'intérieur d'un flacon standard due à la consommation de l'oxygène lors du processus de biodégradation. Le fonctionnement est simple, la bouteille est remplie d'un volume connu d'échantillon, les microorganismes utilisent l'oxygène dissous et l'oxygène gazeux emprisonné dans le flacon pour dégrader les matières organiques. Le dioxyde de carbone produit par cette réaction est capturé, en général, par une pastille d'hydroxyde de sodium. La réaction produit du bicarbonate de sodium et ainsi fait chuter la pression. Le changement de pression est mesuré par un manomètre et est converti, par l'appareil, en oxygène consommé pour estimer la DBO (Figure 1.7).

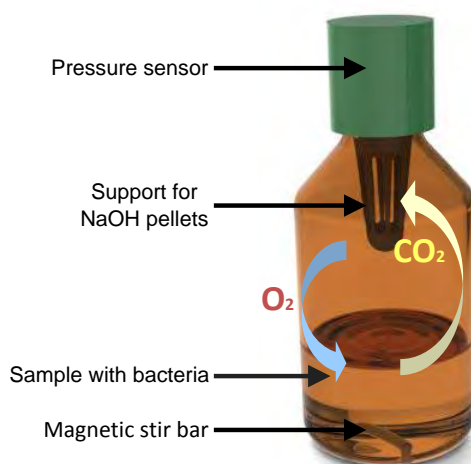


FIGURE 1.7 – Principe de mesure de la DBO par la méthode manométrique.

De nombreux systèmes commerciaux d'évaluation de la DBO basés sur la méthode manométrique sont disponibles sur le marché : OxiTop® (WTW), OxyDirect (Tintometer, Allemagne), BODTrakII (Hach Lange, Allemagne), BM6 (Velp Scientifica, Italie). Cette méthode permet de mesurer de grandes plages de mesures pouvant aller jusqu'à 4000 mg/l de DBO pour certains appareils, la plage de mesure dépend du volume d'air dans le flacon (pour un volume d'échantillon fixe). Ainsi, plus le volume d'air est important plus grande est la plage de mesure, mais la résolution de la mesure est inversement

proportionnelle à la plage de mesure [Caldwell and Langelier, 1948]. Ces méthodes alternatives sont très répandues dans le secteur industriel du fait de leur simplicité d'utilisation. En effet, grâce à leur grande plage de mesure, elles permettent la mesure de la DBO d'échantillons fortement chargés en carbone organique (0 à 4000 mg/l contre 0 à 6 mg/l avec le procédé de référence).

1.3.2 Bioluminescence bactérienne

Dans le but de réduire le temps de mesure et la variabilité due à la diversité de la population bactérienne, une équipe japonaise [Sakaguchi et al., 2003, Sakaguchi et al., 2007] a proposé deux méthodes basées sur la luminescence des bactéries. D'après les auteurs, l'émission de bioluminescence est corrélée à l'énergie produite par l'utilisation d'une source de carbone dans des conditions aérobies. Cela signifie que l'intensité de la luminescence augmente avec la croissance de la population bactérienne (bactéries vivantes).

Afin de limiter la variabilité de mesure due à la population bactérienne, les auteurs ont utilisé des souches bactériennes connues, une recombinaison de la souche *Escherichia Coli* contenant les gènes *luxCDABE* issus de *Aliivibrio fischeri* [Sakaguchi et al., 2003] et une souche naturellement bioluminescente, *Photobacterium phosphoreum* [Sakaguchi et al., 2007].

La première méthode, utilisant la souche *E. Coli* recombinée, permet d'estimer la DBO en 2h avec cependant une précision limitée. Le coefficient de détermination (R^2) et la pente (S) du modèle linéaire entre les résultats fournis par cette méthode et la méthode standard pour 7 échantillons ($n=7$) sont, respectivement, 0,674 et 0,385 (avec une erreur importante sur un point à forte concentration). La seconde méthode, utilisant la souche naturellement bioluminescente, montre de meilleurs résultats que la précédente ($r^2=0,995$, $S=1,018$, $n=5$) avec un temps de réponse plus court (20 min).

Néanmoins, la complexité de la réaction de bioluminescence peut limiter le développement de ces systèmes car la réaction est régulée par de nombreux facteurs intracellulaires et extracellulaires [Watanabe and Hastings, 1986, Meighen, 1993, Sung and Lee, 2004], qui peuvent donc affecter l'estimation de la DBO.

1.3.3 Les piles à combustible microbiennes

Dans le but d'éliminer la limitation de l'oxygène dans la réaction de biodégradation, et donc d'augmenter la plage de mesure, des équipes de recherche ont travaillé sur le développement d'une nouvelle méthode de biocapteurs DBO basée sur les piles à combustibles microbiennes (MFC : Microbial Fuel Cells). Ces piles sont constituées d'un compartiment anaérobie avec une anode et d'un compartiment aérobie avec une cathode. Les deux compartiments sont séparés par une membrane échangeuse de protons (Figure 1.8).

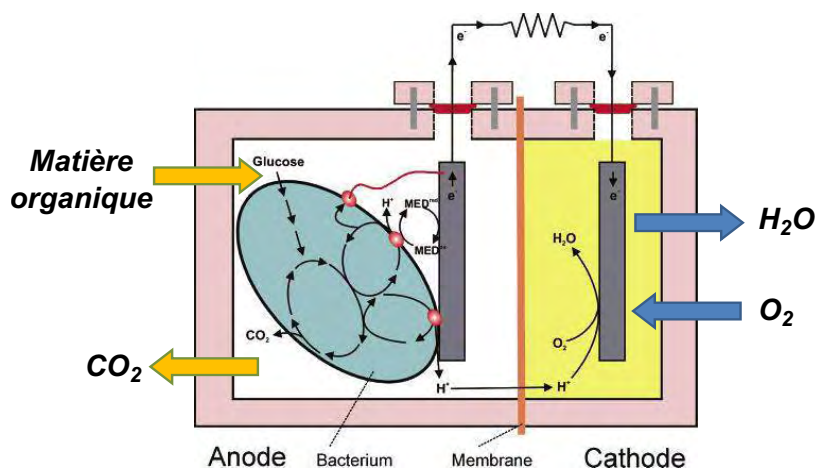


FIGURE 1.8 – Schéma présentant le principe de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne.

Dans le compartiment anaérobie, les micro-organismes dégradent la matière organique et produisent des électrons et des protons [Grzebyk and Pozniak, 2005, Rabaey and Verstraete, 2005]. En milieu aérobie, les bactéries utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électron nécessaire à la réduction des composés organiques, cependant dans le compartiment anaérobie d'un MFC il n'y a pas d'oxygène, les bactéries ont donc besoin d'un autre accepteur d'électron, tel que l'anode du MFC. Les protons migrent de ce compartiment vers la cathode à travers la membrane, tandis que les électrons passent de l'anode à la cathode par l'intermédiaire d'un circuit électrique externe, où de l'oxygène est réduit pour former de l'eau. Le flux d'électron génère alors un courant électrique mesurable proportionnel à l'activité de biodégradation microbienne, ce qui permet d'estimer la DBO d'un échantillon.

Parmi les systèmes décrits dans la littérature sur ce sujet, quelques-uns ont été évalués avec des échantillons environnementaux réels [Kim et al., 2003, Chang et al., 2004, Kumlanghan et al., 2007, Di Lorenzo et al., 2009, Zhang and Angelidaki, 2011, Hsieh and Chung, 2014]. La MFC développée par Kim et al. [Kim et al., 2003] montre une bonne corrélation avec la DBO_5 obtenue par la méthode normalisée ($r^2=0,999$, $S=1,002$), cependant l'évaluation a été réalisée sur seulement trois échantillons ($n=3$). Plus récemment, Hsieh et al. [Hsieh and Chung, 2014] ont développé une MFC qu'ils ont évaluée sur huit échantillons. Deux échantillons, issus d'eaux usées industrielles ont montré une mauvaise corrélation avec la DBO_5 obtenue par la méthode normalisée, les six autres échantillons (issus du réseau domestique, de rivière polluée et de l'industrie porcine) ont montré une bonne corrélation avec la DBO_5 normalisée ($r^2=0,990$, $S=1,102$ et $n=6$).

Un seul système commercial basé sur cette technologie a été référencé. Ce capteur de DBO, le High Accuracy BOD Sensor 2000 Analyzer (HABS-2000), est fourni par Korbi Co. (Corée). Selon le fabricant, ce biocapteur est basé sur des bactéries électrochimiquement actives attachées sur l'électrode de la MFC permettant l'évaluation de la DBO. Aucune information n'est disponible quant à la nature de ces microorganismes (origine, densité, diversité). La HABS-2000 est capable d'évaluer la DBO d'un

échantillon en environ 30 min (réglable) sur une plage de mesure de 0,1 à 200 mg de DBO/l avec une erreur de mesure inférieure à 5%.

Ce biocapteur intègre une étape de prétraitement destinée à détruire la microflore des échantillons à analyser par exposition aux ultra-violets (UV). La destruction de cette microflore rajoute du carbone organique parasite. La DBO alors mesurée n'est pas la représentation de la réelle charge carbonée de l'échantillon, mais représente l'ensemble source de carbone initialement présente et source de carbone de la microflore détruite.

1.3.4 Utilisation d'un médiateur redox pour la mesure de la DBO

Habituellement, les microorganismes oxydent la matière organique dans des conditions aérobies. Cependant, quand un médiateur redox est présent dans le milieu, il agit comme un accepteur d'électron au lieu de l'oxygène [Bennetto et al., 1983, Ramsay and Turner, 1988, Learoyd et al., 1992, Yoshida et al., 2000]. Par conséquent, la quantité de médiateur redox réduit générée par la réaction de biodégradation est directement proportionnelle à l'activité métabolique (et donc à la quantité de matière organique biodégradable) et permet l'évaluation de la DBO. Le principal avantage de ces médiateurs se situe au niveau de la réaction de biodégradation qui ne dépend pas de l'oxygène dans le milieu réactionnel [Pasco et al., 2000]. De plus, avec un médiateur redox, il n'est pas nécessaire de diluer les échantillons pour diminuer la charge organique à dégrader.

Les biocapteurs basés sur l'utilisation d'un médiateur sont issus de la technologie des MFC. En effet, certains MFC utilisent un médiateur redox [Bennetto et al., 1983, Roller et al., 1984] qui sera réduit par les bactéries puis ré-oxydé au contact de l'anode, les électrons peuvent alors être transférés des bactéries à l'anode. D'autres MFC n'utilisent pas de médiateur, on dit alors qu'ils sont *mediator-less*, pour cela ils utilisent des bactéries réductrices de métaux, tels que *Shewanella putrefaciens*, qui consomment le substrat et transfèrent les électrons directement à l'électrode [Kim et al., 1999b, Kim et al., 1999a, Kim et al., 2002].

Les premiers biocapteurs utilisant un médiateur, décrit par Pasco et al. [Pasco et al., 2000] et Yoshida et al. [Yoshida et al., 2000], sont basés sur la réduction électrochimique de l'hexacyanoferrate de potassium(III), [HCF(III)] en hexacyanoferrate de potassium(II), [HCF(II)]. L'ajout de matières dégradables au milieu contenant un excès de médiateur redox [HCF (III)] entraîne une augmentation de l'activité métabolique des bactéries et donc une augmentation de la quantité de médiateur réduit [HCF (II)]. La réoxydation du HCF(II) génère un courant quantifiable par un transducteur coulométrique [Pasco et al., 2000] ou ampérométrique [Yoshida et al., 2000]. Suite à ces articles, plusieurs études ont été réalisées pour améliorer les performances de ces dispositifs [Catterall et al., 2001, Catterall et al., 2003, Trosok et al., 2001, Oota et al., 2010].

Les biocapteurs basés sur un seul médiateur redox électrochimique ont été principalement développés

avec l'utilisation de cellules procaryotes [Yoshida et al., 2000, Pasco et al., 2000, Catterall et al., 2001, Catterall et al., 2003, Timur et al., 2007]. Les médiateurs hydrophiles sont solubles dans le milieu aqueux autour de la cellule, mais ne traversent pas la membrane cellulaire pour pénétrer dans le cytoplasme [Baronian et al., 2002]. Leur utilisation semble donc se limiter à la détection du catabolisme dans les cellules procaryotes qui ont des protéines redox du transport des électrons respiratoires qui se situent dans la membrane cellulaire et sont accessibles à partir du périplasme. En revanche, les médiateurs lipophiles sont solubles dans la membrane cellulaire et peuvent pénétrer dans le cytoplasme pour interagir avec les chaînes de transport d'électrons situés dans les membranes internes. En 2002, Baronian et son équipe [Baronian et al., 2002] ont proposé un système à deux médiateurs rédox combinant du potassium hexacyanoferrate(III) (un médiateur hydrophile) et de la ménadione (un médiateur lipophile) en utilisant des cellules eucaryotes (*Saccharomyces cerevisiae*). La ménadione a la capacité de traverser les membranes cellulaires, et de réagir avec le NAD(P)H pour générer du ménadiol [Rabinowitz et al., 1998]. Le ménadiol transporte les électrons du compartiment intracellulaire vers la paroi cellulaire afin de réduire le médiateur hydrophile. La réoxydation de l'hexacyanoferrate de potassium (II) produit alors un courant proportionnel à l'activité cellulaire [Yashiki and Yamashoji, 1996].

Cette stratégie a été utilisée par des chercheurs japonais [Nakamura et al., 2007c], en 2006, pour concevoir un biocapteur hors-ligne jetable de type micro-batch (Figure 1.9) utilisant *S. cerevisiae*. En présence de la matière organique biodégradable, le courant généré par les réactions d'oxydo-réduction dans la puce est mesuré avec un système à deux électrodes et converti en DBO.

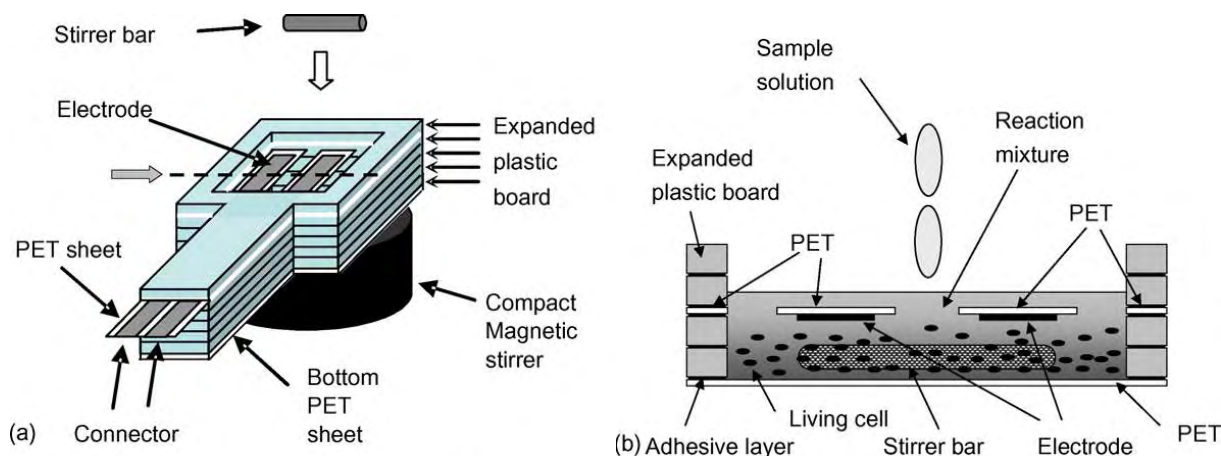


FIGURE 1.9 – Représentation schématique du dispositif développé par Nakamura et al. [Nakamura et al., 2007c]. (a) vue en perspective du capteur, (b) vue en coupe du capteur.

Un an plus tard, Nakamura développa deux nouveaux biocapteurs optiques, l'un basé sur la production de chimioluminescence [Nakamura et al., 2007a], et l'autre sur la colorimétrie [Nakamura et al., 2007b]. La chimioluminescence est produite grâce à la réduction de la ménadione en ménadiol, par la réaction redox de la matière organique par *S. cerevisiae* en présence d'un composé biodégradable (Figure 1.10).

Chapitre 1. Contexte et positionnement de l'étude

La réoxydation du ménadiol génère du peroxyde d'hydrogène qui réagit avec le luminol et les anions hydroxyde, catalysée par l'hexacyanoferrate de potassium (III), pour produire de la chimioluminescence. Le biocapteur colorimétrique, développé par Nakamura, utilise du 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) comme indicateur de couleur. Les corrélations de ces deux systèmes avec la DBO normalisée sont respectivement, [$r^2=0,925$, $S=0,088$ et $n=3$] et [$r^2=0,726$, $S=0.219$ et $n=3$].

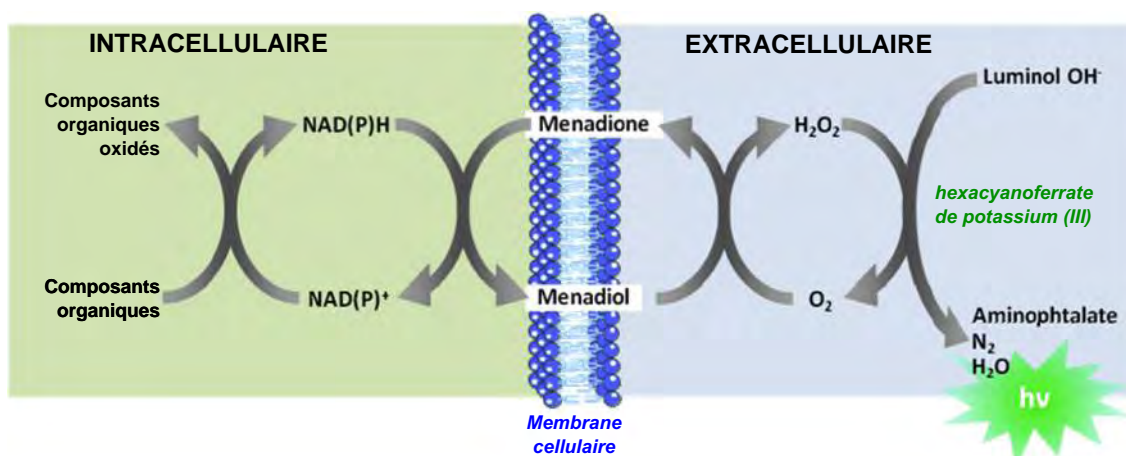


FIGURE 1.10 – Schéma représentant la réaction de chimioluminescence pour estimer la DBO.

Tout comme le DCIP, la résazurine $C_{12}H_7NO_4$ est un médiateur redox qui peut être utilisée comme indicateur colorimétrique. En effet, la résazurine est un colorant bleu (absorbance optimale à 605 nm) qui devient rose après réduction électrochimique en résorufine (absorbance optimale à 573 nm) [Czekanska, 2011].

Ce médiateur peut également être utilisé en fluorescence. La résazurine est un médiateur bleu non fluorescent soluble dans l'eau, il pénètre dans les bactéries et se réduit en résorufine ($C_{12}H_7NO_3$, molécule rose fluorescente et soluble dans l'eau) par l'activité cellulaire. Dudal [Dudal et al., 2006] et Tizzard [Tizzard et al., 2006] ont développé une méthode sur microplaque 96 puits sur la base de la résazurine pour évaluer la DBO. L'intensité de fluorescence émise dans les puits de la microplaque, après la période d'incubation, est directement proportionnelle à la quantité de matière organique dégradée par les microorganismes dans les échantillons analysés. Par conséquent, la mesure de la fluorescence produite donne une estimation de la DBO. Cette stratégie a été utilisée dans le test commercial en microplaque 96 puits (Enverdi) fournies par Envolure (une société française fondée par Dudal et Pautremat). Cette méthode permet d'obtenir une estimation de la DBO_5 plus rapidement qu'avec la méthode standard (48 h par rapport aux 5 jours requis par la méthode de référence). De plus la plage de mesure accessible avec cette méthode passe de 6 mg DBO/l, pour la méthode standard, à 300 mg DBO/l.

D'après S. Jouanneau [Jouanneau et al., 2014], il semble que les temps de réponse obtenus avec les médiateurs redox sont beaucoup plus courts qu'avec la méthode standard. La raison en est qu'il s'agit probablement, selon l'auteur, que le médiateur agit comme un accepteur d'électrons au lieu de l'oxygène et permet l'accélération de la réaction de biodégradation. L'utilisation de souches pures sélectionnées (bactéries ou levures) à des densités cellulaires plus élevées que celles employées dans le test de DBO standardisé peut également expliquer la différence observée avec la méthode standard.

1.3.5 Biocapteur à base de bactéries immobilisées sur électrode

Une grande partie des articles recensés dans la littérature utilisent des bactéries immobilisées. Cette stratégie a été décrite pour la première fois en 1977 par Karube [Karube et al., 1977]. Depuis, plusieurs études ont été publiées décrivant des systèmes destinés à la mesure de la DBO à l'aide de bactéries immobilisées, avec ou sans pré-traitement de l'effluent.

Le principe de cette mesure consiste en l'immobilisation des bactéries qui permettent un contact direct avec l'électrode de mesure. La DBO est estimée à partir de la consommation d'oxygène mesurée par l'électrode (rapport entre la consommation d'oxygène avec et sans échantillon). Selon les auteurs, cette configuration permet, d'une part, une réduction du temps d'analyse de l'échantillon et, d'autre part, une simplification de l'analyse. Différentes méthodes d'immobilisation ont été utilisées, cependant trois groupes se démarquent.

Chapitre 1. Contexte et positionnement de l'étude

Dans le premier cas, les bactéries sont piégées à l'intérieur d'un réseau de polymères qui limite leurs mouvements. Plusieurs matrices ont été évaluées, telles que l'alginate [Kumlanghan et al., 2008], l'agarose [Raud and Kikas, 2013], le poly(carbamoyle)sulfonate (PCS) [Chan et al., 2000], le gel de silice [Oota et al., 2010], l'alcool polyvinylique (APV) [Preininger et al., 1994], le polyuréthane [Koester et al., 2006], l'ormosil-APV [Dai et al., 2004, Jiang et al., 2006]. Tous ces polymères sont biocompatibles et ont une faible toxicité pour les micro-organismes. Néanmoins, le polymère choisi dépend de l'application. En effet, la simplicité d'utilisation des polymères dépend, généralement, de leurs caractéristiques physiques (stabilité mécanique, chimique, thermique ou photochimique).

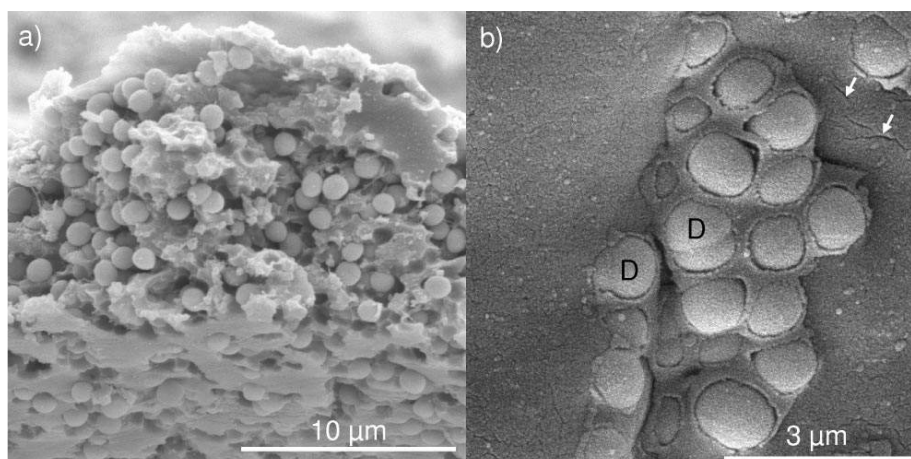


FIGURE 1.11 – Photographies par microscope électronique à balayage de bactéries immobilisées dans un polymère polyuréthane. a) grossissement 2000 fois, b) grossissement 10000 fois : on y distingue des divisions cellulaires (D). [Koester et al., 2006]

Le second procédé d'immobilisation consiste à prendre en sandwich les bactéries entre deux couches de polymères. Plusieurs combinaisons de polymères ont été utilisées dans la littérature, telles que les membranes de dialyse/membrane Téflon [Liu et al., 2000], membrane d'acétate de cellulose/membrane d'éthylène-propylène fluoré (FEP) [Li and Chu, 1991], membrane polycarbonate/membrane Téflon [Suriyawattanakul et al., 2002]. La dernière méthode d'immobilisation microbienne consiste à adsorber les cellules dans des supports solides, par exemple, des membranes poreuses (cellulose [Chee et al., 1999b], fibres de verre [Arlyapov et al., 2012] ou nylon [Rastogi et al., 2003]).

Dans la plupart des cas, la mesure de l'oxygène est réalisée avec une électrode ampérométrique (électrode de Clark). Néanmoins, parmi les biocapteurs décrits ci-dessus, certains systèmes n'utilisent pas ce type de sonde. En effet, les biocapteurs développés par Preininger [Preininger et al., 1994], Dai [Dai et al., 2004] et Jiang [Jiang et al., 2006] utilisent une sonde fluorescente (un complexe de ruthénium) pour surveiller la consommation de l'oxygène dissous résultant de la biodégradation de la matière organique (voir paragraphe 1.3.4). Enfin, le système développé par Liu [Liu et al., 2012] repose sur un biofilm microbien formé sur la surface interne d'un tube de verre. Le principe diffère légèrement des procédés décrits auparavant étant donné que les microorganismes ne sont pas en

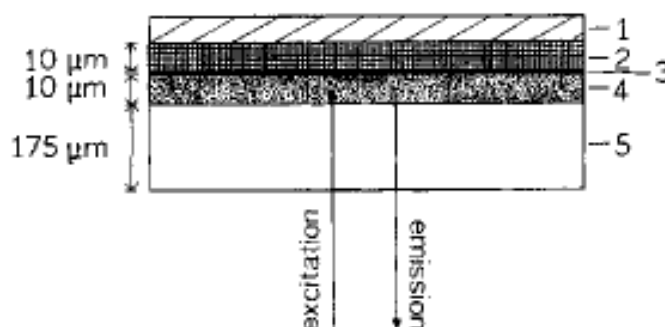


FIGURE 1.12 – Exemple de biocapteur à membrane avec des levures immobilisées dans de l'AVP [Preininger et al., 1994]. 1 : couverture en polycarbonate, 2 : levures immobilisées dans une couche d'AVP, 3 : couche d'isolation optique, 4 : couche fluorescente sensible à l'oxygène, 5 : support polyester inerte et imperméable aux gaz.

contact direct avec la sonde à oxygène. L'échantillon à analyser circule en flux continu à l'intérieur du tube de verre, et la consommation d'oxygène est mesurée à la sortie du tube contenant le biofilm microbien.

Selon les auteurs, ces biocapteurs sont capables d'estimer la DBO₅ avec une durée d'analyse qui ne dépasse pas 90 minutes. Cependant, les résultats de la validation ne sont pas toujours divulgués ou sont non pertinents pour la surveillance de l'environnement (facteur de corrélation <0,6). Généralement, les biocapteurs de la DBO sont basés sur une seule souche microbienne (levure ou bactérie), au lieu du mélange microbien utilisé dans la méthode de référence. Les travaux récents de Raud et Kikas [Raud and Kikas, 2013] proposent une stratégie alternative pour prédire la valeur de la DBO sur un panel bactérien composé de sept souches utilisées individuellement. A cet effet, les données fournies par chacune des souches sont simultanément analysées avec des modèles statistiques. Les résultats sont prometteurs car les valeurs de la DBO prédites sont totalement corrélées avec la DBO₇ mesurée (DBO sur 7 jours) ($r^2=1$, $S=1$ et $n=30$).

Afin d'améliorer la précision et la rapidité des biocapteurs basés sur des bactéries immobilisées, plusieurs équipes de recherche ont ajouté une étape de prétraitement avant la phase de mesure. Certains polluants récalcitrants (c'est-à-dire, les composés de poids moléculaire élevé) peuvent nécessiter une longue phase de latence avant d'être biodégradables par les microorganismes. En raison de la longue période d'analyse requise par le procédé de référence, certains de ces composés sont pris en compte dans la mesure standard de la DBO, mais pas dans les essais expérimentaux des biocapteurs. Le but de cette étape supplémentaire consiste à hydrolyser, physiquement ou biochimiquement, les macromolécules, présentes dans les échantillons, en composés de poids moléculaire plus faible qui peuvent être biodégradés plus facilement que les composés de base [Beltran et al., 1997]. L'hydrolyse consiste à décomposer une substance par la dissociation de l'eau.

Chee et al. ont utilisé deux méthodes de prétraitement physico-chimique pour améliorer l'efficacité

de leur biocapteur à bactéries immobilisées [Chee et al., 1999b] : l'ozonation [Chee et al., 1999a] ou l'irradiation par ultra-violet (UV) [Chee et al., 2001]. A partir des résultats obtenus avec la première méthode de prétraitement, il apparaît que l'ozonation n'améliore pas les performances des biocapteurs, à la différence de l'irradiation UV. En effet, dans l'étude basée sur cette technologie, la corrélation entre le biocapteur et la méthode de référence augmentait lorsque les échantillons étaient prétraités.

Dans le cas des prétraitements biochimiques, ce sont des enzymes spécifiques qui vont permettre de dégrader des macromolécules biologiques en composés plus petits. En 1998, Reiss ajouta un prétraitement enzymatique à l'échantillon avant l'analyse avec le biocapteur [Reiss et al., 1998]. Cela a permis d'augmenter de manière significative (6%) l'efficacité du biocapteur à prédire rapidement la DBO₅. Toutefois, le système est décrit pour une application spécifique (échantillons contaminés avec de l'amidon). Une approche similaire a été proposée par Kim et Park basée sur un prétraitement enzymatique conçu pour hydrolyser les disaccharides et/ou les polysaccharides [Kim and Park, 2004]. Cependant, les résultats obtenus avec le prétraitement s'écartent significativement des valeurs de DBO fournies par la méthode standard. En effet, certains composés récalcitrants sont dégradés par l'hydrolyse enzymatique au cours de l'analyse, mais ne le sont pas par la méthode standard.

1.3.6 Biocapteur basé sur des technologies de bioréacteurs ou chemostat

Les biocapteurs de DBO basés sur la technologie bioréacteur/chemostat ont été principalement développés pour les applications en ligne. Le principe de ces biocapteurs est basé sur le contrôle de la consommation de l'oxygène par les microorganismes en contact avec l'échantillon, comme avec la méthode standard. A la différence où, ils sont continuellement alimentés en eaux usées saturées en oxygène dissous [Vernimmen et al., 1967]. Une sonde à oxygène mesure les variations du taux de respiration des bactéries pour déduire la DBO dans l'échantillon. Ainsi, avec ce système, d'une part, la densité cellulaire est plus élevée que dans l'environnement, en raison de l'alimentation en continu en matière organique, et, d'autre part, la population microbienne dans le bioréacteur est totalement adaptée au substrat organique, ce qui réduit considérablement le temps d'analyse. Le temps de réaction est généralement inférieur à 45 min, et cela permet de surveiller en temps réel les effluents.

De nombreuses études ont été menées sur ce type de système. En 2004, Liu a publié une étude [Liu et al., 2004a, Liu et al., 2004b] sur le développement d'un biocapteur de DBO rapide pour le suivi en ligne des procédés de traitements biologiques (Figure 1.13). Dans ce système, les microorganismes, issus de boues activées provenant d'une station d'épuration municipale, sont maintenus en milieu liquide à l'intérieur d'une cellule de mesure avec une membrane de dialyse pour effectuer les analyses. Le temps de réponse est de près de 60s (avec $r^2=0,544$, $S=0,789$ et $n=4$).

Deux autres biocapteurs de type bioréacteur ont été développés par Wang et al. [Wang et al., 2010] et Villalobos et al. [Villalobos et al., 2010] Dans ces systèmes, les bactéries sont immobilisées dans

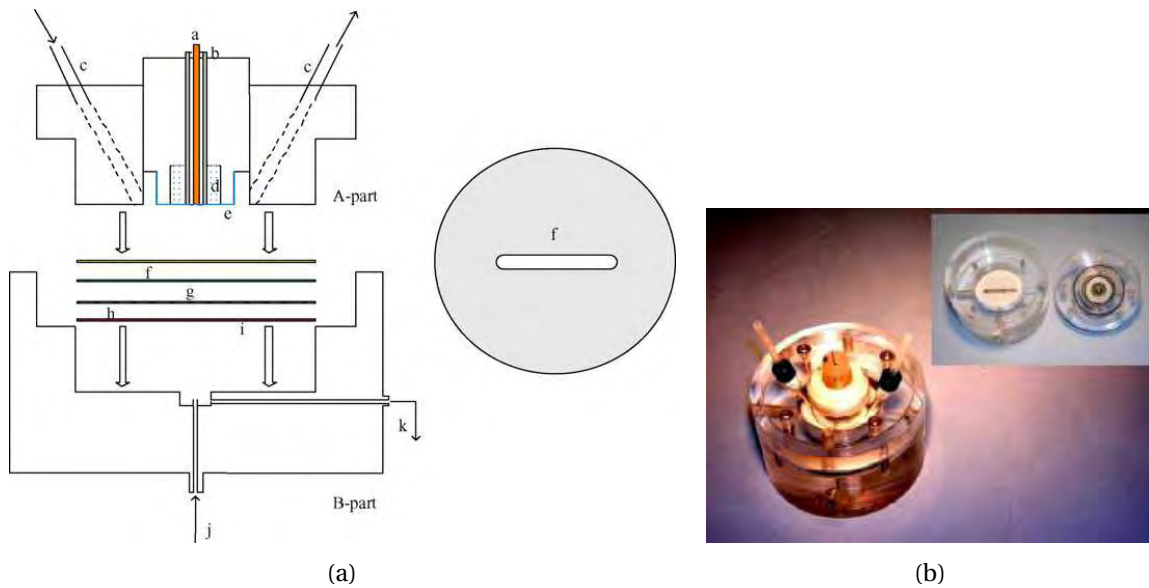


FIGURE 1.13 – Représentation du biocapteur DBO développé par Liu et al. (a) représentation schématique, (b) photographie du système [Liu et al., 2004a, Liu et al., 2004b]. Le biocapteur est composé d'une cathode Pt (a), d'une Anode Ag (b), d'un tube pour l'injection et l'élimination des bactéries (c), d'une chambre à électrolyte (d), d'une membrane en Teflon perméable aux gaz (e), d'une feuille de plastique avec un canal elliptique (f), d'une membrane de dialyse (g), d'un fil en acier inoxydable (h), d'une membrane torique en caoutchouc (i), d'une entrée (j) et d'une sortie (k) pour l'échantillon.

des billes d'AVP/alginate en suspension dans un bioréacteur. La performance de ces systèmes semble intéressante. Le temps de réponse est proche de 30 min avec une forte corrélation avec les résultats obtenus avec la méthode de référence ($r^2=0,99$ et $S \approx 1$ [Wang et al., 2010, Villalobos et al., 2010]). Cependant la corrélation a été obtenue sur un nombre limité d'échantillons (3 et 5).

Une version microfluidique de ce type de système a été développée récemment par Torrents et al. [Torrents et al., 2012]. Le système est constitué d'une chambre de réaction et d'un micro-canal dans lequel circule l'électrolyte séparés par une membrane perméable à l'oxygène. La chambre de réaction contient des bactéries et l'échantillon à analyser. Le micro-canal apporte, en flux constant, l'électrolyte saturé en oxygène. L'oxygène diffuse à travers la membrane du micro-canal vers la chambre de réaction afin d'être consommé par les bactéries. L'oxygène est mesuré en sortie du micro-canal, et les informations récoltées permettent d'estimer la valeur de la DBO.

1.3.7 Un regard critique sur les systèmes actuels de DBO

Classiquement, la DBO est déterminée selon la méthode normalisée que nous avons décrite dans le paragraphe 1.1. Cette méthode mesure la consommation d'oxygène dissous dans le but d'estimer la valeur de la DBO. Bien que ce test soit l'un des plus répandus dans le domaine de la surveillance de l'eau, celui-ci montre certaines limites en terme de précision et de durée d'analyse.

Chapitre 1. Contexte et positionnement de l'étude

En effet, une variabilité importante des résultats, de l'ordre de 20%, obtenues dans les laboratoires certifiés, a été observée. Cette valeur tend à augmenter entre les laboratoires en raison de la variabilité des populations microbiennes utilisées [Guyard,].

De plus, le temps de mesure nécessaire pour la réalisation de cette méthode est trop long (5 jours) [Riedel et al., 2002]. Notamment, dans le cas de l'utilisation de la méthode manuelle (Figure 1.2(a)), car elle ne permet qu'une analyse ultérieure de la qualité des eaux usées. Ainsi, elle ne semble pas être, aujourd'hui, l'outil le plus adapté à la surveillance de l'environnement en temps réel. Les systèmes automatisés ou semi-automatisés permettent un suivi continu de la biodégradation de l'échantillon, mais ne sont pas encore suffisamment rapides pour évaluer la qualité de l'eau et rétroagir sur le protocole de dépollution, si nécessaire. Ceci est principalement dû à la température d'incubation décrite dans la norme.

Quelle que soit la méthode de mesure employée, manuelle, semi-automatique ou entièrement automatisée, la plage de mesure de la charge organique est limitée par la quantité d'oxygène dissous. Cela pose problème lorsque l'échantillon est fortement chargé, car il doit être dilué afin que l'on puisse observer entièrement sa dégradation. Ceci ajoute ainsi des imprécisions sur l'interprétation des résultats.

La seule utilisation de la méthode normalisée n'est pas suffisante pour déterminer la qualité de l'eau. En effet, les eaux issues de l'industrie chimique, de l'industrie des métaux ou de l'activité agricole, contiennent une quantité importante de produits toxiques (métaux lourds, pesticides, hydrocarbures, etc...). Cette toxicité peut modifier l'activité bactérienne, voire même l'inhiber complètement. De ce fait, le test normalisé de DBO n'est plus capable de fournir une information fiable sur la biodégradabilité de l'eau.

En raison de l'utilisation mondiale du test DBO, et de toutes les limitations que nous venons de décrire, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à la conception de nouvelles méthodes, alternatives aux tests standardisés, d'évaluation de la DBO qui vont du bio-essai statique au biocapteur en ligne. Certaines de ces alternatives ont été présentées précédemment.

Une alternative pour le développement futur serait d'utiliser individuellement plusieurs souches microbiennes afin de conserver la capacité à dégrader un large panel de carbone organique, tout en simplifiant le contrôle des microorganismes [Raud and Kikas, 2013]. L'utilisation d'une diversité de souches microbiennes pour estimer la DBO implique la mise en œuvre d'outils d'analyses statistiques plus complexes que les méthodes généralement utilisées dans les publications basées sur une régression linéaire. En effet, cette approche nécessite d'analyser sur plusieurs paramètres les données fournies par l'ensemble des souches.

Enfin, il est important d'insister sur l'absence de contrôle de la toxicité dans les essais présentés dans cet état de l'art. La conséquence directe de ceci, est le risque de sous-estimer la valeur de la DBO. En effet, l'effet toxique d'un échantillon peut entraîner une modification du comportement bactérien,

1.4. La microtechnologie au service de l'environnement ; le projet Bioguard au cœur de la problématique

voire même provoquer une forte mortalité de la population bactérienne. De ce fait, le test de DBO indiquera, alors, une absence de consommation de l'oxygène dissous malgré la présence potentielle de matières biodégradable. Par conséquent le développement des futurs biocapteurs devrait intégrer un capteur de toxicité.

1.4 La microtechnologie au service de l'environnement ; le projet Bioguard au cœur de la problématique

Depuis le développement grandissant de la microélectronique sur semi-conducteurs dans les années 60, les chercheurs se sont naturellement tournés vers l'élaboration de systèmes, miniatures, plus complexes, afin de répondre à la fois à un besoin de précision et de rapidité de mesure. C'est alors dans les années 80 que les premiers microdispositifs sont apparus : les MEMS (Micro Electro Mechanical Systems). Leurs représentants les plus connus et utilisés se retrouvent dans nos ordinateurs sous la forme de têtes de lecture des disques durs, et dans nos imprimantes sous forme de têtes d'impression. Au cours des années 90, des recherches visant à appliquer les MEMS à la biologie, la chimie et le biomédical ont été menées. La manipulation des fluides aux petites échelles s'est très rapidement montrée indissociable de ces systèmes. Cela a permis la naissance et le développement de la microfluidique. Ce développement va être encore accéléré par l'émergence au début des années 2000, des technologies de moulage des canaux dans des polymères comme le PDMS (PolyDiMéthylSiloxane). Ces technologies permettent la réalisation rapide de dispositifs à faible coût. Nous assistons, depuis, au développement de nombreuses fonctions intégrées directement sur puces, telles que des pompes, des vannes, des mélangeurs formant des microsystèmes et assurant des fonctions liées à un domaine d'activité ou d'application.

La réalisation et le développement de l'ensemble de ces fonctions a permis l'émergence du concept "laboratoire sur puce" ou LOC. Le concept est de regrouper un ensemble de fonctions microfluidiques sur un même dispositif permettant la réalisation d'analyses biologiques (détection de virus, cellules tumorales...), environnementales (détection de polluants, charge carbonée de l'eau) et chimiques (détection d'espèces spécifiques). Le développement des laboratoires sur puce s'est fait dans l'optique de faciliter les analyses des espèces d'intérêts, en complétant ou remplaçant les techniques standards. Ces dernières nécessitent généralement des temps de préparation importants, de lourds équipements, des volumes d'échantillons considérables mais surtout des temps d'analyse non négligeables. Ces délais, entre le prélèvement et les résultats, peuvent s'avérer particulièrement critiques pour certaines analyses, telles que, la détection de certaines pathologies ou d'une pollution chimique dans les eaux rejetées dans l'environnement. L'objectif premier des laboratoires sur puce a donc été de développer des systèmes de détection permettant d'obtenir rapidement les résultats, en se basant sur les technologies de la microfluidique. Cette miniaturisation a permis de concevoir des systèmes pouvant être amenés sur le terrain et pouvant répondre aux mêmes besoins que les équipements classiques plus

imposants, tout en utilisant des volumes d'échantillons et de réactifs plus petits.

En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation d'un consortium bactérien défini est nécessaire pour évaluer avec précision et reproductibilité la qualité de l'eau. De ce fait, l'utilisation des systèmes traditionnels ne peut se faire car cela nécessiterait de dupliquer le système pour chaque souche bactérienne, cela augmenterait alors grandement l'impact au sol pour cette analyse. De plus, la miniaturisation d'un système complet de mesure de la qualité de l'eau permettrait d'effectuer une analyse sur site. En plus de cela, l'intégration de l'ensemble des souches dans un seul et même système permet de maîtriser parfaitement les conditions expérimentales appliquées aux différentes souches, et ainsi réduire les erreurs apportées au résultat. Nous pouvons voir un autre intérêt à cette miniaturisation en la réduction de la variabilité des résultats due à la préparation des échantillons par la main de l'Homme. L'intégration de fonction automatique telles que des pompes, des vannes, des switches, etc. . . , permettrait de réduire à la fois l'imprécision et la durée de la manipulation.

C'est dans cet esprit que le projet ANR Ecotech Bioguard (2011-2014) a vu le jour. Ses concepteurs ont voulu développer un système qui puisse répondre aux normes environnementales actuelles et aux besoins des gestionnaires des stations d'épuration, sans pour autant augmenter la surface au sol nécessaire à cet équipement. Le développement d'un microsystème complet s'avère donc nécessaire. Il permettrait de lier la microtechnologie et la biologie dans un but commun : la protection de la faune et la flore par le suivi de la qualité de l'eau et la prévention rapide de tout risque de pollution.

2 Conception du capteur

Nous avons vu, dans le chapitre 1, l'intérêt de disposer d'une mesure DBO pour le contrôle des eaux usées, notamment dans les stations d'épuration. Parmi les solutions recensées dans la littérature, nous avons retenu une solution basée sur les variations de comportements d'une culture bactérienne en fonction de ses conditions d'environnement. A partir de ces données, nous devons construire un projet complet qui réponde aux exigences de la mesure de DBO.

Ce chapitre est donc consacré à la conception du projet ANR Bioguard (2011-2014). Nous en rappellerons d'abord le cahier des charges et définirons une architecture système qui lui correspond. Nous traiterons ensuite des capteurs que nous utiliserons pour évaluer la DBO. Nous exposerons ensuite l'architecture fluidique d'un système dit « macro » et d'un autre système dit « micro ». Nous étudierons la façon dont les capteurs s'intègrent dans ces systèmes. Finalement, nous expliquerons la gestion de l'environnement de mesure et des lecteurs utilisés pour enregistrer l'information issue des capteurs.

2.1 Cahier des charges du projet

L'instrumentation Bioguard doit être un système complet de mesure de la DBO. Elle doit permettre d'assurer, à partir de mesures, in situ ou en laboratoire, le suivi de l'état des eaux usées issues d'une installation biotechnologique ou de stations d'épuration. A plus long terme, elle devrait répondre à des besoins sur site isolé. Cela suppose une miniaturisation profonde des instruments de détection conçus en vue d'une portabilité et d'une autonomie poussée, tant en terme de communication que d'énergie. Ces exigences impliquent donc que l'on engage un travail d'intégration microsystème, non seulement pour démultiplier les cellules de mesure sur un même support mais également pour espérer réduire les temps d'analyse et de calcul de la DBO de l'échantillon en test.

Ainsi, sachant que le temps de mesure de cinq jours fixé par la norme est trop long pour un suivi en temps réel de la qualité de l'eau, le système Bioguard devra proposer une méthode alternative à la méthode standard. Il proposera ainsi une DBO_T avec un facteur temps T le plus court possible, de

l'ordre de quelques heures.

D'un autre côté, le système doit également être capable de mesurer une pollution organique d'au moins 35 mg DBO/l (limite fixée par la norme), la limite haute n'étant pas fixée au démarrage du projet, ce sont les expériences et les technologies employées qui fixeront cette limite.

Pour avoir une estimation simultanée des principales composantes chimiques présentes dans le prélèvement, le système Bioguard devra permettre de traiter les réponses tirées d'un panel bactérien de 15 souches soigneusement sélectionnées (voir chapitre 1). La DBO sera déterminée par un panel de 10 souches spécialisées, ceci afin qu'il y est au moins une souche capable de dégrader les composés présents généralement dans les eaux de rejets des stations d'épuration. La toxicité de l'eau sera évaluée par un panel de 5 souches bactériennes naturellement bioluminescentes.

Conceptuellement, le biocapteur Bioguard est intimement associé à l'idée d'une carte amovible et adaptable, contenant, dans les microsystèmes envisagés, les microorganismes lyophilisés. Elle permettra d'effectuer dix mesures de la qualité de l'eau (DBO et toxicité), et sera sacrifiée lorsqu'elle aura été entièrement utilisée. L'association de différentes souches bactériennes à l'intérieur de la carte consommable impose une étanchéité parfaite inter-puits pour éviter tous risques de contaminations croisées.

Le système complet, associant le lecteur et la carte, sera installé en sortie de stations d'épuration, de systèmes d'assainissement non collectifs ou encore sur les réseaux d'eaux pluviales. Ces effluents sont, généralement, chargés de nombreuses matières, dissoutes ou en suspension, et parfois de grosses particules. Il n'est donc pas envisageable de prendre l'effluent tel quel et de l'injecter dans le microsystème, un filtre à particules de 20 μm sera placé en amont du système.

Finalement, le système doit permettre une estimation de la DBO avec une plus-value par rapport au test standard en termes de précision, de sensibilité et de rapidité d'exécution. Afin de percer dans le marché, il se doit d'être compétitif sur le prix de l'équipement en comparaison avec un automate actuel de DBO dont le coût moyen est proche de 15 k€.

2.2 Analyse du cahier des charges

L'examen du cahier des charges invite à concevoir une instrumentation avec trois composantes : une puce assurant la culture bactérienne, un système de gestion des fluides, et un capteur pour caractériser cette culture bactérienne. L'ensemble étant piloté par une carte électronique de mesure et de traitement.

En ce qui concerne la puce MEMS, les contraintes décrites dans le cahier des charges délimitent le choix des matériaux, ce qui par incidence imposera le procédé de fabrication. Les matériaux utilisés ainsi que les capteurs devront résister aux différentes étapes de lyophilisation, à savoir une congélation

à -80°C pendant 3h suivie d'une lyophilisation à -50°C et à 0,05 mbar durant 36h. De plus, ils doivent être biocompatibles, c'est-à-dire non nocifs pour les bactéries et non-biodégradables. Par ailleurs, selon le choix du système de transduction à mettre en place, ils devront également être étanches à l'oxygène et, si possible, transparents.

Concernant la partie fluide, afin de ne pas boucher les canalisations de la puce, nous avons estimé, en nous basant sur des travaux expérimentaux, que la section minimale des canalisations doit être 5 fois supérieure à la plus grosse des particules susceptibles de se trouver dans l'échantillon, soit une section minimale de $100 \times 100 \mu m^2$. Dans le cadre du projet dans lequel s'intègre cette thèse, le comportement de plusieurs souches bactériennes doit être étudié indépendamment et simultanément. Cela implique que ces populations doivent être isolées les unes des autres et avoir chacune leur circuit d'alimentation afin d'éviter tout risque de contaminations croisées.

Dans une première étape, la transduction liée à l'activité bactérienne, qui est à la base de la mesure de DBO, sera mesurée par l'intermédiaire d'un capteur d'oxygène dissous. Dans ce cas la question de l'étanchéité, non seulement des puits de mesure entre-eux, mais également vis-à-vis de l'air ambiant, sera d'autant plus cruciale que l'oxygène est présent à 21% dans l'air, et qu'il peut diffuser dans l'échantillon sous test. Les capteurs utilisés pour l'évaluation de la DBO seront des capteurs à lecture optique dit "optodes", dont le fonctionnement sera décrit ci-dessous (paragraphe 2.3.1). Les mesures seront réalisées en chambre noire, à température régulée à 30°C afin d'amener les bactéries à leur vitesse de croissance optimale.

La difficulté de réalisation d'un tel système résidera notamment dans l'injection des fluides, qui doit s'effectuer sans modification du caractère hermétique de la carte, en particulier par rapport à l'air ambiant.

Au vu des difficultés de maîtrise du processus de mesure de la DBO par des optodes, en particulier à cause d'un défaut prévisible d'étanchéité des microsystèmes, nous avons introduit, dans une seconde étape complémentaire de la première, une mesure d'oxygène dissous par l'intermédiaire d'une molécule spécifique : la résazurine (paragraphe 2.3.2). En la mélangeant à l'échantillon en test, cette molécule jouera le rôle d'un capteur d'oxygène distribué dans la population bactérienne.

Le cahier des charges étant désormais établi dans ses grandes lignes, nous pouvons travailler sur le développement d'un prototype en analysant les différentes fonctions qu'il doit remplir. Nous avons alors établi le schéma de la figure 2.1 pour définir les cinq blocs fonctionnels du système, selon leur rôle particulier et leurs interactions respectives.

Nous identifions dans ce schéma :

1. L'échantillon sera, pour nos expériences, et dans un premier temps, du milieu Luria Bertani (LB), afin de valider le système avec un milieu facilement dégradable par la population bactérienne. Dans un second temps, du milieu M9 sera utilisé, afin d'avoir un contrôle parfait sur la

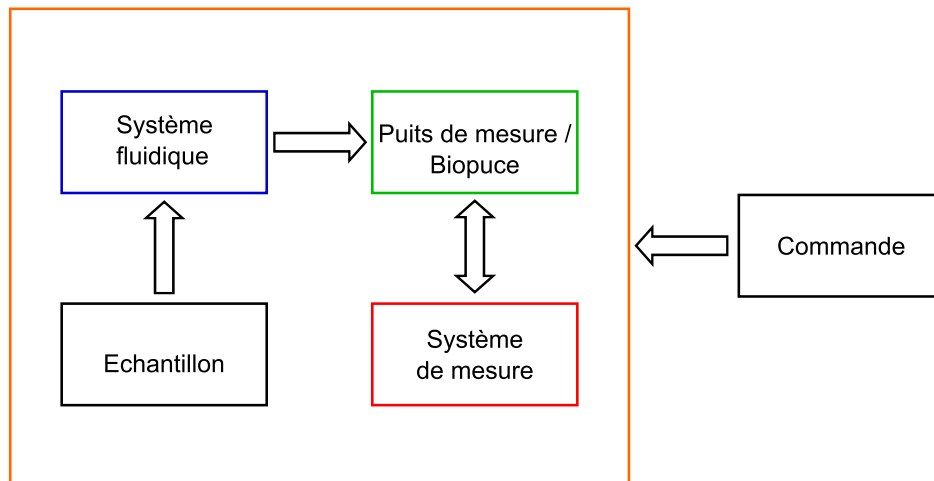


FIGURE 2.1 – Schéma d'analyse en bloc fonctionnel du système

composition de l'échantillon (la composition du milieu M9 est décrite dans le chapitre 3).

2. Le système fluide doit assurer le transport des fluides au travers des canalisations vers le puits de mesure.
3. Le puits de mesure/biopuce est l'élément dans lequel s'effectue la mesure de l'oxygène lors de la réaction de biodégradation. Sa géométrie est conditionnée par le capteur d'oxygène utilisé.
4. Le système de mesure comprend le capteur d'oxygène, à placer au plus près de la culture bactérienne, qui doit permettre de mesurer le paramètre caractéristique de la DBO, et son électronique associée.
5. Le dernier sous-ensemble est constitué de la partie gestion et contrôle électronique. Elle pilote les éléments électromécaniques permettant le déplacement des fluides, ou bien encore de réguler la température dans la chambre de mesure.

La partie sensible, c'est-à-dire la carte contenant les biopuces, sera installée dans un caisson isotherme capable de maintenir une température constante de 30°C pendant les périodes de mesure. Il devra également permettre de protéger les puits de mesure et le lecteur des autres sources de lumières parasites.

2.3 Capteurs pour l'évaluation de la DBO

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, il existe plusieurs méthodes et outils d'évaluation de la DBO_5 , indicateur principal de la qualité des eaux de rejetées des stations d'épuration. Pour la mesurer, le suivi d'espèces chimiques contenues dans l'échantillon de test, telle que le dioxyde de carbone [Chiappini et al., 2010], peut être utilisé. Des équipes de recherches ont utilisé récemment, des médiateurs redox permettant de mettre en évidence un lien entre la quantité de médiateur réduite par les bactéries et la concentration en matières organiques dégradables. L'avantage de ce type de capteur

tient au fait que la réaction de biodégradation n'est pas dépendante de l'oxygène [Pasco et al., 2000].

Néanmoins, la plupart de celles encore usitées à grande échelle, sont basées sur la mesure de l'oxygène dissous présent dans un échantillon. Elles peuvent être classées en deux catégories : les capteurs électrochimiques et les capteurs optiques. Pour les premiers, tels que les sondes de Clark, leur utilisation en DBO est limitée par leur consommation de l'oxygène présent ; elles nécessitent une maintenance régulière et un recalibrage fréquent du capteur [Yotter and Wilson, 2004, Park et al., 2005, Kim et al., 2008]. Les seconds, tels que les optodes, émettent un signal de fluorescence, en retour d'un signal lumineux d'excitation, proportionnel à la concentration en oxygène dissous, sans en consommer. Leur autre avantage réside dans leur robustesse, ce qui nécessite beaucoup moins d'entretien que les sondes électrochimiques.

Dans le cadre de cette thèse, non seulement pour les raisons évoquées ci-dessus, mais également pour orienter notre démarche vers un processus de simplicité de fabrication, d'intégration et d'utilisation des puces instrumentées, nous avons fait le choix d'utiliser des transducteurs optiques. Dans une première étape, ce seront les optodes ; puis, en continuité des résultats obtenus avec ces capteurs, nous introduirons une sorte de capteur distribué dans l'échantillon : la résazurine.

2.3.1 Un capteur d'oxygène dissous : l'optode

Une optode nécessite trois éléments pour fonctionner (Figure 2.2) : un produit chimique qui réagit à la substance à analyser, un polymère pour immobiliser le produit chimique et une instrumentation (fibre optique, une source de lumière, un détecteur, etc...).

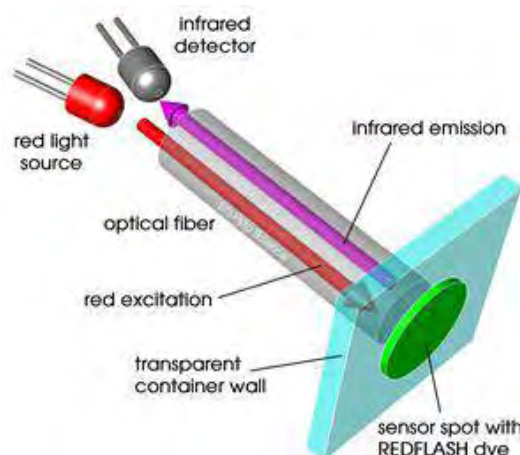


FIGURE 2.2 – Système de mesure par optode. Il comporte une source lumineuse, un photodétecteur, une fibre optique et le complexe chimique formant la couche sensible en contact avec l'échantillon [PyroScience,]

Le principe fondamental de fonctionnement des optodes repose sur la capacité de certaines substances

Chapitre 2. Conception du capteur

à agir comme désactivateurs (quencher) dynamiques de fluorescence (Figure 2.3). Lorsque cette substance est excitée par un faisceau de lumière à une longueur d'onde donnée, celle-ci émet un signal de fluorescence en retour, décalé en longueur d'onde, dont l'intensité est inversement proportionnelle à la concentration de la substance à analyser. En absence de substance à analyser, la fluorescence est élevée (Figure 2.3 - 1). Par contre, lorsque la substance est en grande quantité, la molécule fluorescente, à l'état excité, transfère son énergie vers la substance par collision, la fluorescence est donc plus faible (Figure 2.3 - 2).

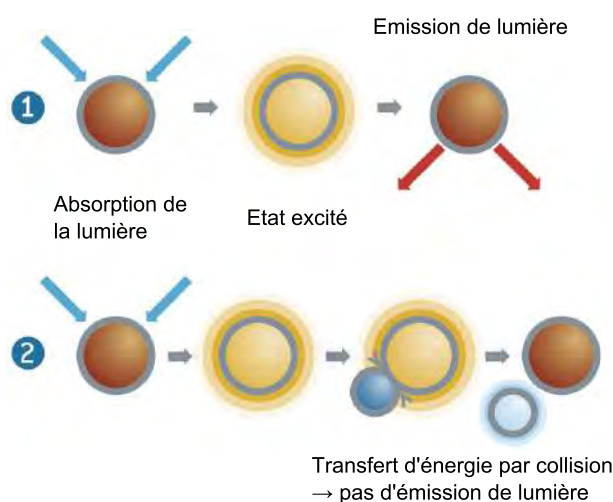


FIGURE 2.3 – Schéma expliquant le fonctionnement d'une optode reposant sur le principe du quenching. Emission de fluorescence en absence d'oxygène (1), le transfert de l'énergie de la molécule excitée vers la molécule d'oxygène par collision empêche l'émission de fluorescence (2).

Le matériel chimique utilisé dans les optodes est généralement un complexe organométallique, tels que les complexes de ruthénium(II) [Li et al., 1993, Hartmann et al., 1995, Mills and Thomas, 1997, Ji et al., 2010], les complexes de platine(II) [Papkovsky et al., 1992, Lee et al., 1993, Kolle et al., 1997, Mills and Lepre, 1997], les complexes d'or(I) [Mills et al., 1997], les complexes d'aluminium(III) [Costa-Fernandez et al., 1998], etc...

Chaque complexe possède sa propre sensibilité en longueur d'onde, ainsi on peut trouver des optodes sensibles dans le bleu et d'autres dans le rouge, par exemple. Le plus largement utilisé est le complexe de ruthénium(II), car il a une longue durée de vie de luminescence, des temps de réponse rapides, une forte absorption dans le visible, un grand décalage de Stokes (décalage en longueur d'onde) et une grande stabilité photochimique. Il existe de nombreux lecteurs, fournis avec les optodes, permettant de les intégrer dans une chaîne de mesure. Elles devraient permettre de mesurer jusqu'à 40 mg d' O_2/l [Hartmann et al., 1995].

L'optode est donc un bon moyen pour évaluer l'oxygène dissous dans une proportion de 0 à 100 % de sa concentration dans une solution, car il n'en consomme pas lors des mesures.

De plus, il est très simple de l'intégrer dans un système instrumental et ne nécessite, par ailleurs, pas d'entretien particulier.

2.3.2 Un capteur réparti : la résazurine

La résazurine ($C_{12}H_7NO_4$) est une molécule jouant le rôle d'un médiateur d'oxydo-réduction soluble dans l'eau et non fluorescent. Tout comme l'oxygène, elle peut être utilisée comme accepteur d'électrons dans la réaction de biodégradation d'un composé organique présent dans l'échantillonensemencé de bactéries. Sa présence permet d'estimer l'activité des bactéries à travers sa réduction en un sous-composé rose et fluorescent (Figure 2.4) : la résorufine ($C_{12}H_7NO_3$).

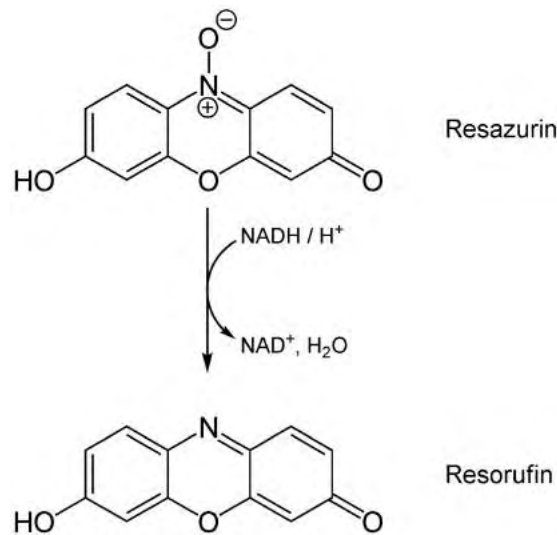


FIGURE 2.4 – Schéma illustrant la réduction de la résazurine en résorufine par la réaction de biodégradation par les bactéries.

L'intensité de fluorescence émise par la résorufine, lorsqu'elle est soumise à une lumière verte, est donc directement proportionnelle à la de résazurine réduite par les bactéries et donc à la quantité de matière organique qu'elles ont dégradées [Dudal et al., 2006, Tizzard et al., 2006].

D'après certains auteurs [Dudal et al., 2006, Tizzard et al., 2006, Rocher et al., 2011], cette méthode permet de réduire considérablement le temps de mesure de la DBO_5 (maximum 15 h contre 5 jours). De plus, la gamme de mesure en DBO atteignable par cette méthode est plus importante, 300 mg O_2/l avec le kit Enverdi proposé par la société Envolution [Envolution, 2006].

L'utilisation de ce médiateur, paraît donc être une bonne alternative pour la mesure de la DBO. D'une part, car il est soluble dans l'eau, donc il admet une intégration extrêmement simple dans un système, et d'autre part, car il offre de très bonnes performances, en termes de temps d'analyse et gamme de mesure.

2.4 Systèmes fluidiques « macro » et « micro »

Dans cette partie, nous nous attarderons à décrire, dans un premier temps, la conception fluidique du système dit « macro ». Nous y détaillerons son architecture, un gradient de concentration permettant d'effectuer un criblage des conditions expérimentales, et finalement, pour ce système, les puits dans lequel s'effectue la mesure de la consommation de l'oxygène suite à la réaction de biodégradation.

Dans un second temps, nous exposerons la conception du système « micro ». Il comprend une évaluation des contraintes vis-à-vis du cahier des charges et du capteur, et le détail de conception de deux générations de biopuce. La seconde étant une amélioration de la première suite à un défaut rencontré sur celle-ci.

2.4.1 Le système à macro-volume

La réalisation d'un système, dit « macro », a plusieurs avantages. En effet, dans la mesure où il utilise des technologies conventionnelles, il permet un prototypage rapide d'une instrumentation complète. Qui plus est, dans le cadre d'un prototype réalisé durant un projet de recherche, il n'est pas possible d'user une grande quantité de puces pour effectuer les expériences, au risque de dépasser le budget alloué au projet. De ce fait, la réalisation d'un système « macro » permet de multiplier le nombre d'expériences. Pour cela, nous avons donc conçu et réalisé un prototype réutilisable, qui serait une ébauche du produit final, comprenant, en plus, une fonction de nettoyage et rinçage permettant la réutilisation du système.

2.4.1.1 Son architecture

Nous allons concevoir ce système « macro » pour l'évaluation de la DBO avec une seule souche bactérienne (*E. Coli*). En imaginant qu'il pourra être dupliqué, moyennant quelques aménagements, pour fonctionner avec la totalité des souches prévues initialement dans le projet. Pour simplifier le travail de conception, nous n'utiliserons pas de bactéries lyophilisées directement dans la chambre de culture, elles seront réhydratées manuellement puis injectées dans la chambre de culture via une seringue. Sur ce prototype, nous souhaitons pouvoir réutiliser le point de mesure, contrairement au système final, qui lui possèdera une cartouche de mesure jetable. Nous avons donc intégré au prototype une fonction de nettoyage et de rinçage afin de pouvoir épurer le système de toutes traces de bactéries et d'échantillons précédemment utilisés. La fonction de nettoyage est réalisée à l'aide d'une solution d'éthanol à 70 % afin de détruire les bactéries présentes dans le circuit de mesure. Un rinçage du circuit à l'eau DI est ensuite réalisé afin d'effacer toutes traces d'éthanol qui risqueraient de détruire les bactéries de la prochaine mesure et ainsi fausser les résultats.

L'architecture d'un tel système repose essentiellement sur le type d'actionneur choisi pour déplacer

les fluides. Idéalement, la technique la mieux adaptée serait de déplacer les fluides sans contact avec l'actionneur, afin d'éviter que des fluides biologiques ou chimiques des eaux usées se retrouvent en contact avec lui. Cela risquerait de le détériorer si les matériaux le constituant n'étaient pas suffisamment résistants. Ce type de déplacement est généralement réalisé au moyen d'une source de pression pneumatique. Elle est utilisée pour faire monter en pression un récipient dans lequel est placé le fluide, et sous l'effet de cette force, celui-ci se déplace.

Un autre moyen consiste à utiliser une pompe pour liquide. Dans ce cas, le fluide est en contact avec la partie active de la pompe. Si le fluide est composé de matières plus ou moins visqueuses ou collantes, et selon l'architecture de la pompe, la partie active peut se coller et empêcher son fonctionnement. Il existe un grand nombre de pompes fluidiques, qui permettent, pour certaines, un contrôle précis des volumes déplacés.

Durant cette thèse, nous avons testé les deux types d'actionnement. En premier lieu, nous avons testé l'actionnement pneumatique. L'avantage de cette méthode est effectivement le contact limité du fluide avec les éléments fluidiques. L'inconvénient est, par contre, un contrôle imprécis du volume déplacé. En effet, cette méthode nécessite d'avoir une bonne régulation en pression et de rajouter sur le circuit un débitmètre. Si le débit est mal géré, et que le circuit n'est pas configuré pour résister à des pressions trop fortes, alors des fuites apparaîtront. Nous avons ensuite testé l'actionnement avec une micro-pompe à solénoïde. Ce type de pompe utilise l'effet magnétique d'un solénoïde entourant un barreau aimanté. Lorsqu'un courant traverse le solénoïde, le barreau se déplace vers le haut et permet de remplir une micro-chambre de rétention par aspiration. Lorsque le solénoïde n'est plus alimenté, le barreau redescend à l'aide d'un ressort et refoule le liquide vers la sortie. Cette pompe permet de connaître précisément le volume déplacé en connaissant le volume de la chambre et en comptant le nombre d'actionnement de la pompe. Après avoir testé les deux méthodes, nous avons opté pour l'intégration de la micro-pompe à solénoïde dans le système, du fait de sa bonne reproductibilité, de sa précision, et de sa simplicité d'utilisation.

Le choix de l'actionneur étant maintenant fait, nous pouvons alors dessiner le plan de l'architecture du système. Nous devons commencer par poser le nombre d'entrées et de sorties du système. Nous avons, au total, quatre entrées : l'échantillon, les bactéries, la solution de nettoyage (éthanol à 70%), et enfin la solution de rinçage et de dilution (eau DI) ; et une sortie faisant office de poubelle (figure 2.5).

Le cœur du système, délimité sur la figure 2.5 par le rectangle en tirets, se compose des éléments électromécaniques (pompes, électrovannes), d'un gradient de concentration, de quatre puits de mesure et de capillaires permettant de lier l'ensemble de ces éléments.

Dans le but de rendre l'étude de la dynamique de croissance bactérienne plus précise, nous avons réalisé un gradient de concentration afin d'effectuer un criblage de la concentration en carbone organique dans l'échantillon en test. Le gradient est réalisé en mélangeant l'échantillon avec de l'eau DI. Celui-ci possède donc deux entrées, et quatre sorties. Les étapes de conception du gradient sont

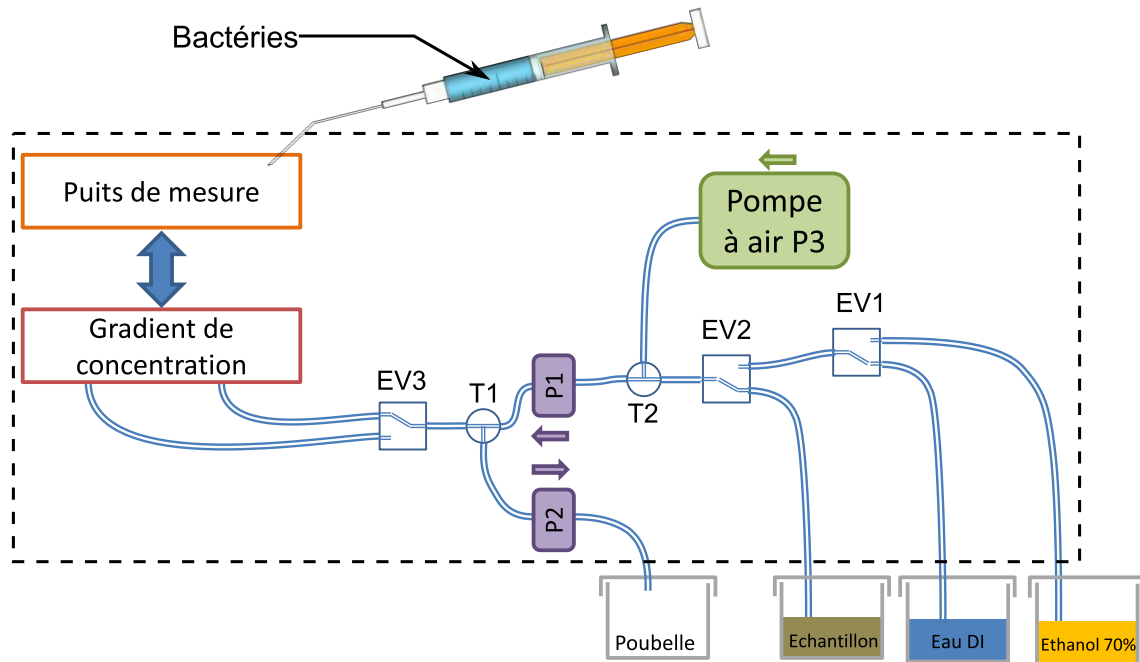


FIGURE 2.5 – Schéma fonctionnel du prototype. EVn sont des électrovannes et Pn sont les pompes à solénoïde.

décrites dans le paragraphe suivant.

Le fonctionnement de ce système est relativement simple. Les électrovannes à 3 voies universelles EV1 et EV2 permettent de sélectionner le fluide à transporter. Tandis que l'électrovanne EV3 sert à sélectionner l'une des deux entrées du gradient de concentration. Une micro-pompe à solénoïde P1 injecte les fluides vers le gradient de concentration. Elle est placée après le sélectionneur de fluide (après EV2) afin de limiter le nombre de pompes à une seule pour l'ensemble des fluides d'entrées. Cet ensemble permet donc de transférer le fluide sélectionné vers les réservoirs de mesure, en passant par le gradient de concentration. L'insertion d'une micro-pompe P2 et d'un té microfluidique T1, entre P1 et EV3, permet d'intégrer un circuit de vidange du système réalisant le gradient de concentration et des réservoirs de mesure. Nous avons ajouté un autre té microfluidique T2 et une pompe à air P3 dans le circuit, entre EV2 et P1, afin de purger les capillaires entre les réservoirs d'entrées et P1. L'activation simultanée des trois pompes devrait permettre de purger les deux micro-pompes P1 et P2, ainsi que les capillaires qui y sont connectés.

Nous avons donc conçu un système fluide relativement simple capable de gérer trois solutions, de vidanger, de nettoyer et de rincer l'ensemble du système.

Nous allons maintenant décrire la conception du gradient de concentration.

2.4.1.2 Génération du gradient de concentration

Les domaines chimiques ou biologiques font souvent appel au criblage multi-concentration pour les études de cytotoxicité, de milieux de culture, des cinétiques en fonction des concentrations des espèces chimiques dans une solution. La réalisation d'un gradient de concentration d'une espèce chimique, dans une solution complexe, permet de réduire les erreurs pouvant être commises d'une préparation à une autre. De plus, cela permet de multiplier les mesures simultanément.

Pour notre projet, l'intégration d'un gradient de concentration peut avoir différentes utilités. Dans le cas d'un système final, il permet de diluer l'échantillon afin de s'assurer de la présence d'oxygène en fin d'analyse. Cependant, il faudrait multiplier le nombre de puits par souche bactérienne au nombre de dilutions de l'échantillon. Cela augmenterait considérablement les dimensions du système. Dans le cas d'un travail de recherche en laboratoire, le gradient de concentration nous permettra d'étudier la variation de la consommation de l'oxygène par les bactéries selon la concentration en carbone organique, dans les mêmes conditions expérimentales : population bactérienne initiale, température d'incubation et paramètres d'acquisition identiques.

Les méthodes de préparation généralement utilisées impliquent l'emploi soit d'un robot de pipetage, soit d'un opérateur. La première méthode est rapide et précise mais nécessite un investissement financier important. La seconde méthode, quant à elle, fait appel à un temps de préparation plus long, auquel se rajoutent des incertitudes de manipulation.

Par ailleurs, le développement des MEMS (MicroElectroMechanical Systems), en particulier ceux destinés à des applications en biologie/chimie tels que les Micro Total Analysis System (μ TAS) ou les Lab On Chip (LOC), a nécessité la mise au point de systèmes microfluidiques utilisant des gradients de concentration. Il existe deux types de gradient de concentration, utilisés selon l'application envisagée : les gradients continus ou les gradients discrétisés (échantillonnage des concentrations).

Nous avons fait le choix d'utiliser un système à gradient discrétisé, car il est plus adapté à notre application. Le principe de fonctionnement des gradients de concentration discrétisés, en microfluidique, peut être classé selon deux catégories, qui se distinguent par leur architecture. Dans un cas, les solutions mères sont diluées entre elles successivement sur plusieurs étages de canalisations afin d'obtenir le gradient voulu ; l'autre solution est de fractionner les solutions mères en un même nombre de branches ayant un débit propre, et la recombinaison finale des solutions permet d'obtenir le gradient souhaité. Quel que soit le type de gradient adopté, leur conception relève de la même méthode ; il consiste à faire l'analogie entre le réseau fluidique et le réseau électrique équivalent, et de calculer les résistances électriques en fonction des contraintes imposées. Des explications sur les écoulements microfluidiques et sur leur analogie avec le réseau électrique sont données en annexe.

Pour comprendre le fonctionnement des gradients de concentration, nous devons d'abord expliquer quelques notions de base. Le cas le plus simple de mélange est présenté sur la figure 2.6. Il met en jeu

deux solutions mères de concentration C_1 et C_2 , et de débit respectif Q_1 et Q_2 .

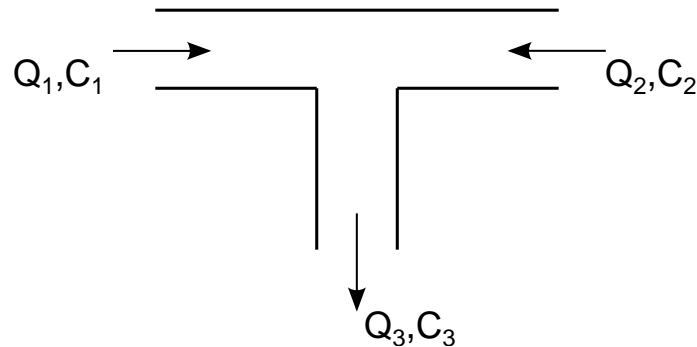


FIGURE 2.6 – Schéma d'un mélange de 2 solutions (débits/concentrations Q_1 et Q_2 / C_1 et C_2) donnant naissance à une solution de débit/concentration Q_3/C_3 .

La concentration C_3 résultant du mélange s'écrit :

$$C_3 = \frac{Q_1 \cdot C_1 + Q_2 \cdot C_2}{Q_3} \quad (2.1)$$

En utilisant l'équivalence électricité/fluidique, la loi des nœuds permet d'écrire : $Q_3 = Q_1 + Q_2$.

Par ailleurs, les débits dans les différentes branches vont être régis par l'architecture des systèmes et la valeur des résistances hydrodynamiques.

Dans cette thèse, nous avons choisi d'étudier les gradients à mélange final car ils sont plus adaptés à notre application. La première étape de conception consiste à définir le type de gradient de concentration final désiré : linéaire, logarithmique, exponentiel ou autres, ainsi que les valeurs des débits de sortie. La plupart de ces systèmes sont composés de deux parties, l'une apportant la solution à échantillonner et l'autre le solvant ; ils seront mélangés pour former le gradient de concentration. Le calcul des concentrations obéit à un calcul de dilutions établi à partir de l'équation 2.1.

Si la matière n'est apportée que par l'une des entrées, Q_1 par exemple, la concentration du mélange, avec un solvant Q_2 , s'écrit [Bang et al., 2004] :

$$C_3 = \frac{Q_1}{Q_3} C_1 \quad (2.2)$$

La complexité de résolution du calcul des débits dépend directement du nombre de sorties. En effet, le système d'équation permettant de connaître les débits des sorties comporte autant d'équations que de sorties du système fluidique. Pour résoudre ce système, il faut établir le schéma électrique équivalent au système fluidique, puis calculer l'ensemble des résistances du circuit en fonction des paramètres du problème (débits d'entrées/sorties). Le calcul des résistances nous permet alors de calculer la longueur des canalisations en utilisant l'expression des résistances hydrodynamiques selon la section des canalisations.

Le schéma fonctionnel, sous forme de boîte noire, du système à gradient de concentration, en fonction de ses entrées et sorties, peut se dessiner ainsi (Figure 2.7) :

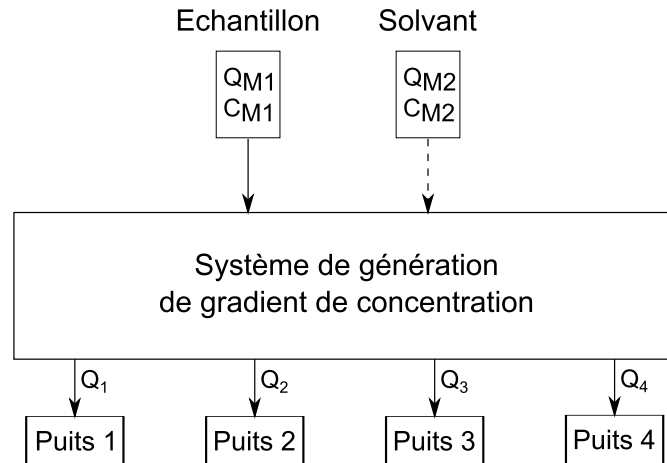


FIGURE 2.7 – Schéma fonctionnel en boîte noire du système permettant de générer un gradient de concentration.

Nous voulons que les quatre puits se remplissent en même temps. Cela suppose que $Q_1 = Q_2 = Q_3 = Q_4$.

Nous souhaitons réaliser quatre concentrations par mélange final, allant de 0 à 100% de l'échantillon mère. Chaque puits doit donc avoir deux entrées : l'une apportant l'échantillon ; et l'autre apportant le solvant. Nous pouvons donc dessiner le système de répartition des fluides (Figure 2.8).

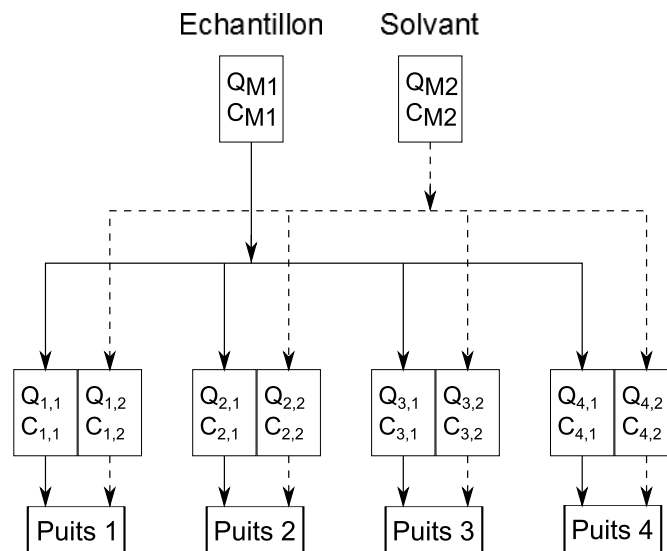


FIGURE 2.8 – Schéma représentant l'architecture du système générant le gradient de concentration.

Avec $Q_{i,j}$ le débit d'une branche et $C_{i,j}$ sa concentration en soluté. Où, i représente la branche entrant dans le puits i , et j représente le fluide entrant (1 : Echantillon, 2 : Solvant). Chacune de ces branches a son débit propre, et diffère des autres branches, afin de réaliser la fonction de concentration à mélange

final.

Nous pouvons définir deux grandeurs α_i , le coefficient de répartition du débit de l'échantillon dans les branches, et β_i le coefficient de répartition du débit du solvant dans les branches. Nous pouvons donc écrire le débit entrant dans chaque puits en fonction des grandeurs α_i et β_i :

$$Q_i = Q_{i,1} + Q_{i,2} = Q_{M1} \cdot \alpha_i + Q_{M2} \cdot \beta_i \quad (2.3)$$

Nous pouvons maintenant définir la valeur de la concentration dans chaque puits i , en remplaçant 2.3 dans 2.1 :

$$C_i = \frac{C_{i,1} \cdot Q_{i,1} + C_{i,2} \cdot Q_{i,2}}{Q_{i,1} + Q_{i,2}} = \frac{C_{M1} \cdot Q_{M1} \cdot \alpha_i + C_{M2} \cdot Q_{M2} \cdot \beta_i}{Q_{M1} \cdot \alpha_i + Q_{M2} \cdot \beta_i} \quad (2.4)$$

Sachant que seul Q_{M1} apporte l'échantillon, nous pouvons écrire l'équation 2.4 d'après l'équation 2.2 :

$$C_i = \frac{C_{M1} \cdot Q_{M1} \cdot \alpha_i}{Q_{M1} \cdot \alpha_i + Q_{M2} \cdot \beta_i} \quad (2.5)$$

Nous souhaitons une concentration maximale de l'échantillon dans le puits 1 et une concentration nulle dans le puits 4. La figure 2.8 peut se simplifier en supprimant la branche du solvant arrivant sur le puits 1 et en supprimant celle de l'échantillon arrivant sur le puits 4 (Figure 2.9).

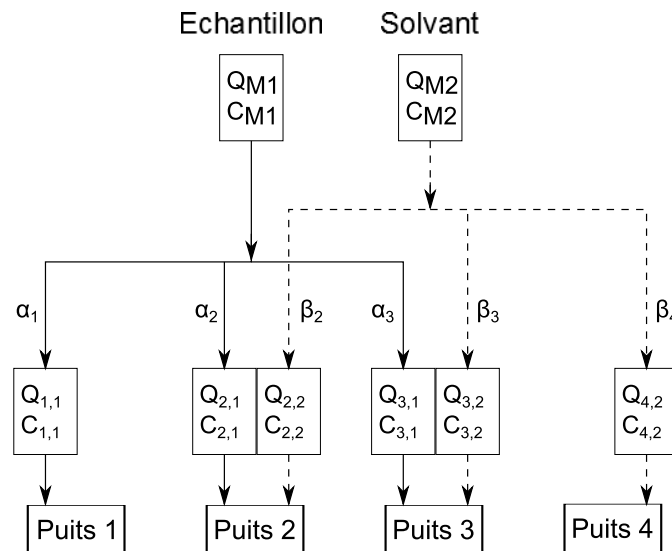


FIGURE 2.9 – Schéma de l'architecture du système à gradient de concentrations simplifié.

Il ne reste plus qu'à dessiner le schéma électrique équivalent du système. Nous pouvons encore simplifier la conception de ce système à gradient de concentration, en symétrisant le débit de ses branches. En effet, en définissant que $\alpha_1 = \beta_4$, $\alpha_2 = \beta_3$ et $\alpha_3 = \beta_2$, alors il devient possible de travailler,

uniquement, sur les résistances hydrodynamiques d'une moitié du système. Le schéma électrique équivalent est alors :

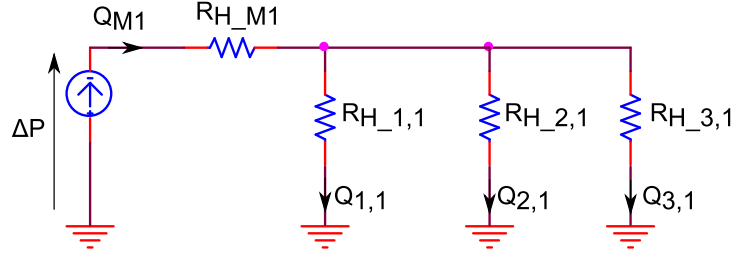


FIGURE 2.10 – Schéma électrique équivalent du système microfluidique.

Avec ΔP la différence de pression entre l'entrée et les sorties, R_{H_M1} la résistance hydrodynamique d'entrée et $R_{H_i,1}$ les résistances hydrodynamiques des branches $(i, 1)$. Nous pouvons alors donner l'équation définissant la résistance hydrodynamique d'une branche $(i, 1)$:

$$C_i = \frac{\Delta P - Q_{M1} \cdot R_{H_M1}}{Q_{i,1}} = \frac{\Delta P - Q_{M1} \cdot R_{H_M1}}{Q_{M1} \cdot \alpha_i} \quad (2.6)$$

Nous voulons réaliser un gradient de concentration de 0 %, 40 %, 60 % et 100 % de l'analyte. Nous pouvons donc définir le système des répartitions α des débits de chaque branche :

$$\begin{cases} \alpha_1 = 1 \\ \alpha_2 = 0,6 \\ \alpha_3 = 0,4 \end{cases} \quad (2.7)$$

Nous pouvons alors obtenir le système des résistances hydrodynamique de chaque branche :

$$\begin{cases} R_{H_1,1} = \frac{\Delta P - Q_{M1} \cdot R_{H_M1}}{Q_{M1} \cdot \alpha_1} \\ R_{H_2,1} = \frac{\Delta P - Q_{M1} \cdot R_{H_M1}}{Q_{M1} \cdot \alpha_2} \\ R_{H_3,1} = \frac{\Delta P - Q_{M1} \cdot R_{H_M1}}{Q_{M1} \cdot \alpha_3} \end{cases} \quad (2.8)$$

Maintenant, nous pouvons extraire $\Delta P - Q_{M1} \cdot R_{H_M1}$ de $R_{H_1,1}$, et le remplacer dans $R_{H_2,1}$ et $R_{H_3,1}$. Le système d'équation 2.8 peut alors s'écrire en fonction de $R_{H_1,1}$:

$$\begin{cases} \Delta P - Q_{M1} \cdot R_{H_M1} = R_{H_1,1} \cdot Q_{M1} \cdot \alpha_1 \\ R_{H_2,1} = \frac{R_{H_1,1} \cdot \alpha_1}{\alpha_2} \\ R_{H_3,1} = \frac{R_{H_1,1} \cdot \alpha_1}{\alpha_3} \end{cases} \quad (2.9)$$

Il ne nous reste plus qu'à définir les dimensions de la canalisation 1, de calculer sa résistance hydrodynamique, puis de calculer les résistances des deux autres canalisations grâce au système d'équation 2.9, afin de les dimensionner à leur tour. De plus, en fixant un diamètre de canalisation identique aux trois branches, seule la longueur changera. Ainsi, pour la canalisation 1, si nous prenons une longueur de 5 cm, celles des canalisations 2 et 3 seront alors respectivement 8,4 cm et 12,6 cm.

Pour la réalisation du gradient de concentration, nous avons utilisé des capillaires découpés à l'aide d'une guillotine, puis assemblés sur une croix microfluidique type *UpChurch* via des connectiques fluidiques du même fabricant. Des exemples de ces dispositifs sont montrés en figure 2.11.

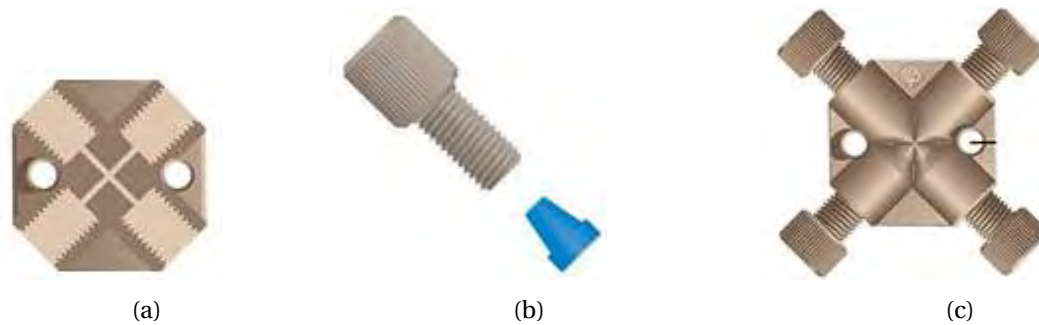


FIGURE 2.11 – (a) schéma d'une croix microfluidique. (b) connectique permettant de fixer le capillaire sur la croix. (c) assemblage de la croix et des connectiques.

La validation de ce dispositif est décrite en annexe. Initialement, nous voulions obtenir un gradient de 100 %, 60 %, 40 % et 0 % de l'analyte. Après caractérisation du gradient réalisé suite à notre étude, nous avons pu vérifier une concentration pour chaque sortie de 100 %, 56,79 %, 39,88 % et 0 % de l'analyte injectée en entrée du gradient.

Il nous reste, à ce niveau, un autre élément du prototype à concevoir : les réservoirs de stockage des bactéries et de l'échantillon à analyser.

2.4.1.3 La conception des réservoirs de mesure

Nous avons fait le choix de réaliser un gradient à mélange final, cela signifie que le mélange s'effectue seulement dans la chambre de mesure, il y a donc deux entrées par réservoir. L'utilisation de bactéries pour la mesure de la DBO amène quelques contraintes à la conception des réservoirs de mesure qui devront être biocompatibles, non biodégradables et transparents.

La forme et la matière des réservoirs sont importantes. En effet, selon la nature du matériau des réservoirs et grâce à la tension de surface de l'eau, celle-ci peut s'accrocher aux parois et notamment aux angles, et donc potentiellement polluer une future mesure. Pour faciliter la pose de l'optode, les réservoirs doivent avoir un côté plat. Nous avons donc choisi de donner aux réservoirs une forme rectangulaire mais avec des angles arrondis, comme on peut le voir sur le schéma de la figure 2.12

représentant un réservoir en trois dimensions.

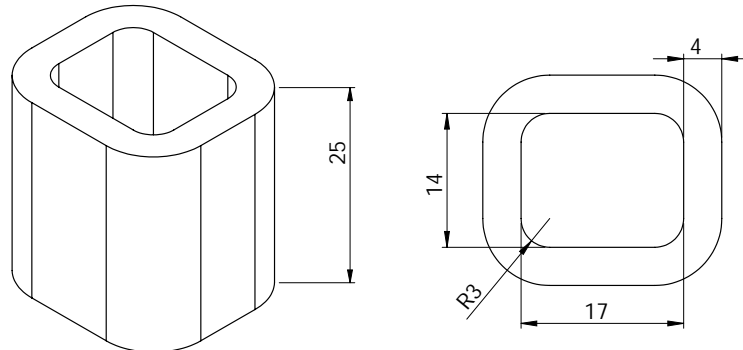


FIGURE 2.12 – Dessin représentant un réservoir et ses dimensions en mm.

Les puits doivent être fermés de part et d'autre, et doivent également assurer l'étanchéité et les accès fluidiques. Deux pièces, en matériau usinable, associées à des joints toriques devraient permettre de maintenir l'ensemble, tout en assurant les fonctions que l'on vient de citer. Lors du remplissage des puits, l'air contenu à l'intérieur doit pouvoir s'échapper, un trou d'évacuation est donc prévu sur la pièce faisant office de capot (Figure 2.13(a)). Ce perçage devrait servir également d'évacuation du trop-plein et jouer un rôle de limitation à la diffusion de l'oxygène. D'après la loi de Fick, la vitesse de transfert d'un gaz à travers une membrane est proportionnelle à la surface et à la différence de concentration du gaz de part et d'autre de la membrane et inversement proportionnelle à l'épaisseur de celle-ci. Ce perçage doit donc être réalisé le plus fin possible.

La géométrie du socle est également importante. En effet, lors de la vidange des puits, il ne doit rester aucun fluide à l'intérieur. Une forme d'entonnoir est donc réalisée à l'emplacement des puits, avec en son centre l'accès fluide servant à l'évacuation des fluides (Figure 2.13 (b) et (c)).

Le maintien des pièces s'effectue par des tiges filetées traversant de part en part le socle et le capot. Les perçages sont réalisés dans les quatre coins des pièces et en leur centre, afin d'homogénéiser la pression appliquée sur les joints des quatre puits pour que l'étanchéité s'opère correctement. La figure 2.14 donne un aperçu de la vue en éclaté de l'assemblage des puits.

Les résultats des premiers tests de consommation de l'oxygène dissous par les bactéries montreront une cohérence avec les résultats obtenus avec des tests classiques. Néanmoins, le système montrera ses limites à travers la reproductibilité du remplissage des puits. Les résultats de consommation de l'oxygène dissous mesuré par ce système, décrits dans le chapitre 4, seront cependant satisfaisants.

Nous pouvons donc passer à la deuxième étape de notre travail de thèse, qui consiste à miniaturiser le système par l'introduction de la technologie microsystème en vue de l'appliquer à l'évaluation de la DBO.

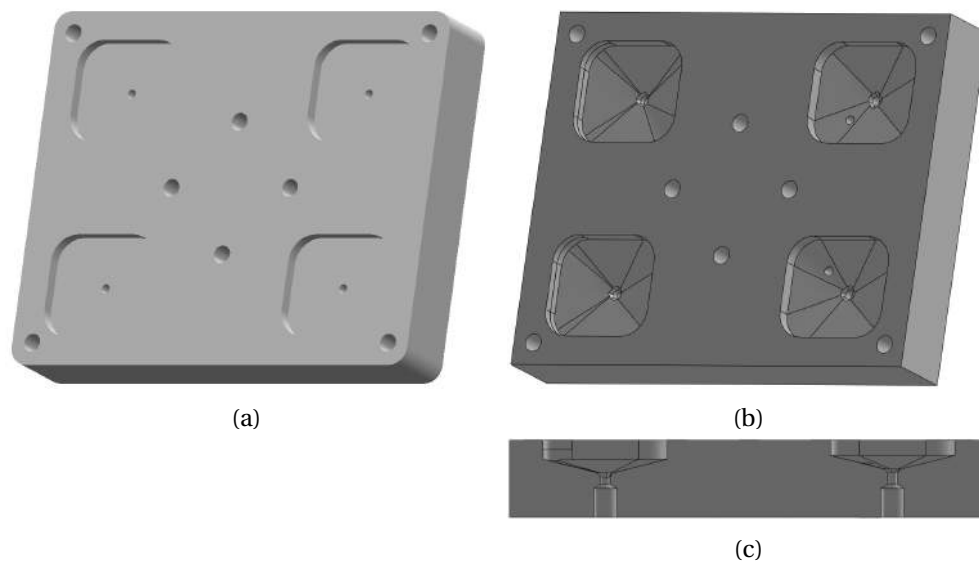


FIGURE 2.13 – Image en 3 dimensions du capot (a) et de la base des réservoirs (b) et (c). (b) base complète vue en perspective, (c) vue en coupe de la base

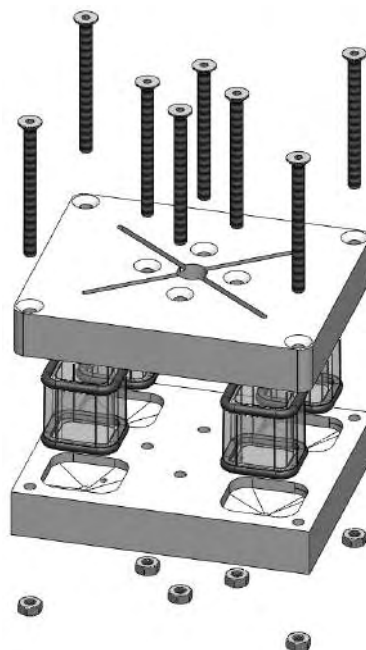


FIGURE 2.14 – Assemblage des différentes parties des réservoir de mesure.

2.4.2 Conception et dimensionnement de la version « micro » : la bio-puce

La miniaturisation du système de mesure de la DBO a pour intérêt principal l'augmentation du nombre de points de test afin de pouvoir réaliser plusieurs mesures simultanées dans un appareil plus petit. Pour cela, il est nécessaire de réduire le volume des échantillons à tester.

Nous allons donc présenter, dans cette partie, les deux générations de puces que nous avons réalisées. La première a été conçue et fabriquée en vue de mesurer l'oxygène dissous avec un système à base d'optode. Les expériences ont montré un défaut de remplissage pour cette génération de puce. En effet, des bulles d'air sont apparues lors des tests. Nous avons alors développé une seconde génération de puce, d'une part pour pallier à ce défaut, et d'autre part pour introduire un nouveau type de capteur à base de résazurine.

2.4.2.1 Les contraintes de conception des biopuces

La lecture du cahier des charges du projet permet de mettre en évidence certaines contraintes liées essentiellement au capteur, aux bactéries et à la partie fluidique.

2.4.2.1.a Contraintes liées aux bactéries

Dans le cadre de ce projet, il a été établi que plusieurs souches bactériennes doivent être intégrées au biocapteur. Cela nous amène à définir des points qui peuvent être bloquants pour la réalisation des puces microfluidiques. Le premier que nous allons aborder concerne la méthode de stockage des bactéries ainsi que leur mode de conservation. En effet, un stockage sur puce microfluidique impose d'avoir des procédés de fabrication compatibles avec le domaine de viabilité des bactéries (température, endommagement des bactéries lors de la fabrication,...) et la méthode de conservation. L'analyse des différents procédés nous a donc amené à envisager une préparation et un stockage des bactéries à l'extérieur du système, puis une injection à l'intérieur de l'appareil de mesure. Afin d'être dans les mêmes conditions que la mesure de DBO₅, les bactéries devront être en suspension dans la solution.

Un autre point pouvant être critique pour la mesure de la DBO est le maintien en activité des bactéries. En effet, une diminution de la population peut entraîner des biais importants dans les mesures. Le matériau doit donc être biocompatible et structurable par les technologies microsystèmes. Plusieurs options se présentent à nous, tels que le PDMS, la SU8, les thermoplastiques. Le matériau sera choisi en fonction de ses caractéristiques, vis à vis du capteur à utiliser, et de sa porosité à l'oxygène.

2.4.2.1.b Contraintes liées au capteur

La mesure de DBO impose un contact entre la sonde et le milieu. Elle peut se réaliser soit par électrochimie, en utilisant par exemple des sondes de Hersh ou des sondes de Clark, soit par mesure de fluorescence, en utilisant des optodes ou un fluorophore, tel que la résazurine. Dans les deux cas, elle nécessite l'intégration d'un capteur au cœur de la puce microfluidique. Pour cela, les capteurs devront être, soit à faibles coûts et compatibles avec les procédés de fabrication afin d'être jetables ;

soit réutilisables et facilement intégrables. L'ensemble de ces paramètres rendent difficile l'utilisation d'un seul capteur pour réaliser la mesure sur un nombre important de puits. Les méthodes de mesure proposées imposent un milieu transparent aux longueurs d'ondes utiles pour la mesure optique de la DBO.

2.4.2.1.c Contraintes liées à la partie fluidique

Dans le cas des puits de dimension micrométrique, l'une de leurs principales difficultés réside dans leur remplissage sans bulle d'air. Pour les alimenter, il est nécessaire d'utiliser des canalisations intégrées dont la section et la longueur seront des paramètres clés. En effet, ils conditionneront non seulement le débit des fluides mais également les dimensions des particules qui vont y circuler. Pour ces dernières, le cahier des charges impose un diamètre de $20\text{ }\mu\text{m}$, ce qui implique des canalisations avec une hauteur de $100\text{ }\mu\text{m}$ minimum.

Actuellement, concernant les éléments extérieurs d'actionnement fluidique, aucune contrainte n'a été définie car leur choix dépendra surtout des dimensions de la partie fluidique. Nous souhaitons, tout de même, que la connexion entre les puces et l'extérieur soit standardisée afin qu'il n'y ait aucune incertitude sur les mesures pouvant venir de cette partie.

Pour la mise en écoulement des fluides, plusieurs options sont envisageables parmi lesquelles des pompes piézoélectriques, des pompes péristaltiques ou bien des générateurs de pression. En vue d'une intégration système poussée, il y aura aussi possibilité d'intégrer des vannes ou des switch directement sur la puce, afin de diminuer au maximum les volumes morts et les longueurs de canalisation.

A la lecture de ces contraintes, nous voyons bien que de nombreux points restent à éclaircir avant la réalisation du premier prototype complet. Il paraît nécessaire de vérifier que les systèmes microfluidiques réalisent des mesures comparables aux dispositifs actuellement utilisés. Pour cela, nous proposons de réaliser un dispositif simple ne contenant qu'un seul puits de mesure. Ce dispositif doit nous permettre de définir des protocoles de fabrication, de remplissage et de mesure dans les puits.

Nous allons, dans un premier temps, nous intéresser à l'intégration des optodes, qui seront pilotées à l'aide d'une fibre optique. Nous nous intéresserons ensuite à l'intégration de la résazurine dans les puces, ce qui nous amènera à modifier ou compléter leur conception.

En pratique, afin de mettre en œuvre rapidement ce dispositif, nous envisageons d'utiliser du PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) car cette technologie est très largement utilisée pour le prototypage rapide.

2.4.2.2 Première génération de puce

Afin de faciliter la réalisation de la puce, nous avons décomposé l'approche en deux parties : la première sera dédiée à la réalisation des réservoirs, et la seconde concernera le capot sur lequel l'optode sera placée et qui permettra de fermer les puits.

L'optode que nous allons utiliser est circulaire de diamètre 5 mm et d'épaisseur 150 μm . Cela nous impose des puits de dimensions comparables, nous avons donc fait le choix d'utiliser des puits circulaires dont le diamètre minimal est de 7 mm afin de pouvoir aisément aligner le capot avec l'optode et le puits. Nous avons décidé de réaliser des réservoirs d'une hauteur de 500 μm afin d'obtenir un volume d'environ 20 μl . Pour les canalisations d'entrée et de sortie, nous avons choisi une section de 500x500 μm^2 , d'une part pour permettre le passage de particules de 20 μm de diamètre en suspension et d'autre part, pour des raisons de simplification de fabrication. En effet, ainsi nous n'avons besoin que d'un seul niveau de canalisation. Pour des questions d'encombrement et de réalisation des supports, nous avons fait le choix de prendre une longueur de 6 mm. Le dessin de cette puce est représenté sur la figure 2.15.

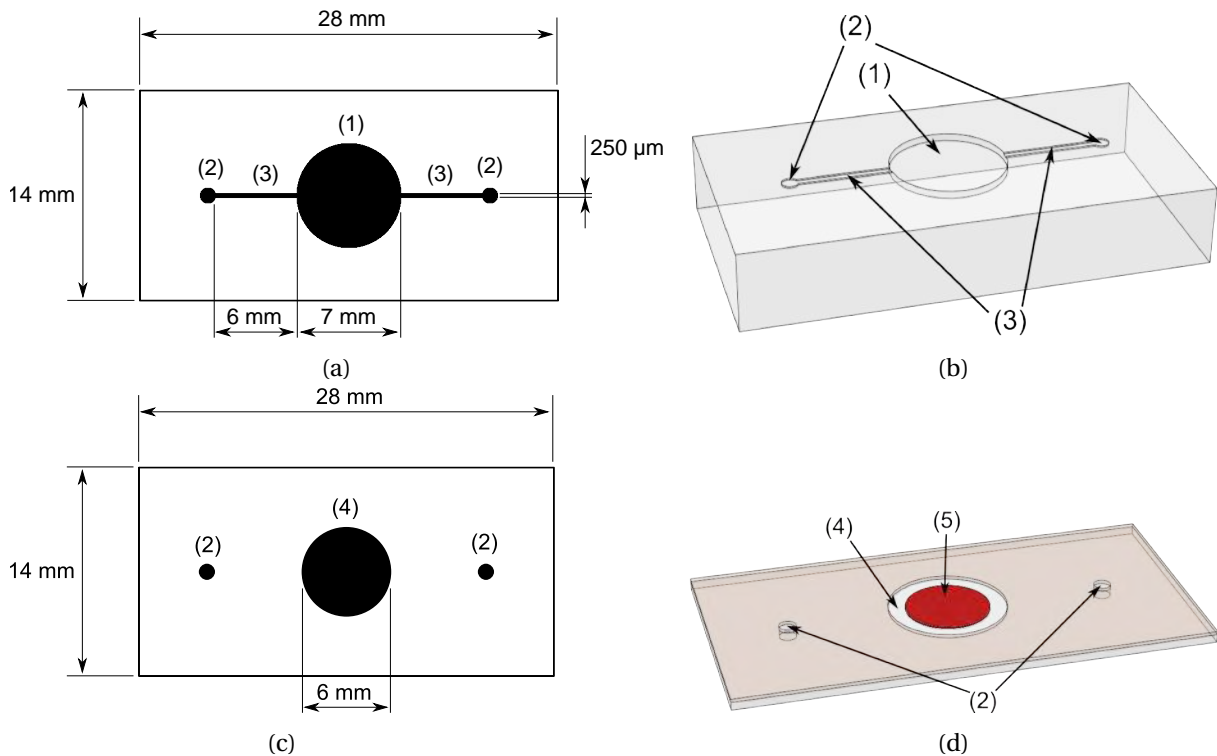


FIGURE 2.15 – Schémas représentant la puce microfluidique en 2D (a) et en 3D (b), et du capot de la puce en 2D (c) et en 3D (d). La puce microfluidique ((a) et (b)) se compose du réservoir de mesure (1), d'une entrée et d'une sortie (2) et de deux canalisations (3). Le capot ((c) et (d)) se compose d'un emplacement incrusté (4) pour accueillir l'optode (5) et de l'entrée et sortie fluidique (2)

Afin de ne pas modifier le volume du puits lors de l'assemblage des deux éléments de la puce, une

Chapitre 2. Conception du capteur

couche de résine d'épaisseur légèrement supérieure à celle de l'optode sera déposée sur le capot (Figure 2.16). Un emplacement pour l'optode sera réalisé dans ce polymère pour y intégrer le capteur. Les connexions fluidiques vers le réservoir seront réalisées au travers du capot (Figure 2.15 (c) et (d)).

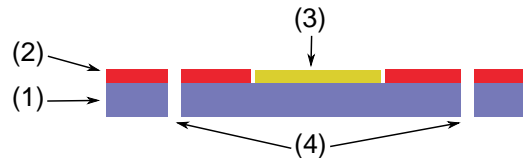


FIGURE 2.16 – Schéma représentant une vue en coupe du capot. (1) lame de verre, (2) la résine, (3) l'optode et (4) les entrées et sorties fluidiques.

Lors des premiers tests, nous avons eu quelques difficultés à remplir correctement la puce sans bulle d'air. En effet, la tension de surface aux parois tire le fluide plus rapidement qu'au centre du puits, et la circularité de celui-ci amène donc le fluide en sortie en se refermant sur lui-même et en emprisonnant ainsi une bulle d'air. Nous avons alors conçu une deuxième génération de puces, afin de faciliter leur remplissage.

2.4.2.3 L'amélioration de la puce : deuxième génération

Comme nous venons de le voir avec la première génération de puces, la difficulté de remplissage du puits était due à sa géométrie.

Nous avons donc donné une forme ovale au réservoir. Ainsi, sur sa longueur et grâce au champ de vitesse du fluide qui est plus important en son centre, le front du fluide peut se stabiliser et avancer à la même vitesse. Afin d'avoir toujours un volume d'environ $20 \mu l$, l'épaisseur du réservoir reste inchangée, et nous avons alors fixé la longueur du réservoir à 8 mm et la largeur à 6 mm. Dans le but de standardiser le procédé de fabrication tout en augmentant le nombre de mesures possibles par puce, nous les avons conçues pour qu'elles puissent s'adapter aux lames de verre de microscope de taille standard ($76 \times 26 \text{ mm}^2$). Ainsi, sur une seule puce nous pouvons placer 8 réservoirs comme on peut le voir sur le dessin de cette nouvelle puce représentée sur la figure 2.17.

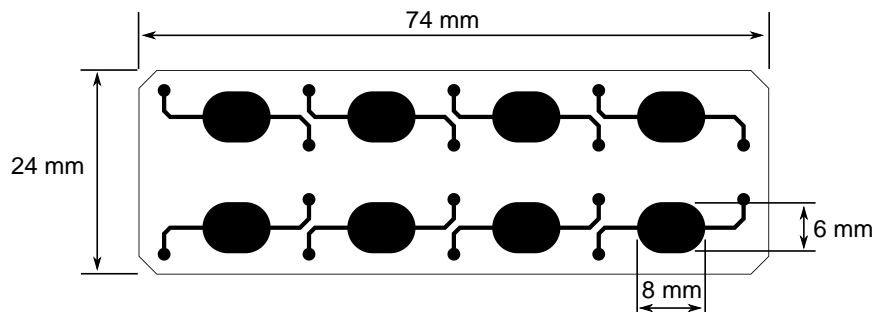


FIGURE 2.17 – Dessin représentant le design et les dimensions de la deuxième génération de puces.

Les tests ont montré un remplissage facile et sans bulle d'air avec cette géométrie de réservoir.

2.5 Instrumentation et système de mesure

Après avoir exposé le cheminement de conception des différentes versions « macro », et « micro » des puces à la base du dispositif de mesure de DBO, nous allons compléter la description de la chaîne de mesure par la partie instrumentale complétant la saisie des mesures fournies par les capteurs.

2.5.1 Instrumentation des capteurs

2.5.1.1 Lecteur optique de l'optode

Un lecteur à fibre optique, fourni par le fabricant, spécialement dédié à la chimie de l'optode permet de l'interroger très facilement. La fibre optique permet d'amener la lumière vers l'optode pour l'exciter et de retourner la fluorescence issue de celle-ci vers le lecteur. Un programme informatique permet de calibrer le lecteur, traiter l'information envoyée par le capteur, afficher et enregistrer les données traitées (Figure 2.18).



FIGURE 2.18 – Lecteur optique FireSting O2 pour optode.

2.5.1.2 Lecteur optique de la résazurine

La lecture du signal de fluorescence émis par la transformation de la résazurine en résorufine nécessite un appareillage spécifique. En effet, les lecteurs de fluorescence actuels sont relativement imposants et coûteux. Pour les plus simples et les moins coûteux, ils sont composés d'une source de lumière au Xénon et d'un jeu de filtres en excitation et en émission, associés généralement à un photodétecteur sensible [Hansatech Instruments,]. Pour les systèmes les plus perfectionnés, ils sont généralement capables de mesurer la fluorescence sur une bande spectrale large et font alors appel à un monochromateur, en émission et en excitation, afin de sélectionner précisément la longueur d'onde, et à un photomultiplicateur [Thermo Scientific,].

Chapitre 2. Conception du capteur

Dans les deux cas, ces systèmes ne sont pas intégrables dans un autre système. Nous devons alors concevoir notre propre lecteur de fluorescence. Pour en simplifier la conception, nous allons le concevoir spécifiquement pour la détection de la résorufine.

Comme on peut le voir en figure 2.19, le schéma fonctionnel du lecteur se compose de sept parties : (1) le système microfluidique comprenant l'échantillon à analyser, (2) une source de lumière pour exciter les molécules de résorufine dans l'échantillon, (3) un filtre pour sélectionner la longueur d'onde de la source de lumière, (4) un filtre d'émission pour sélectionner la longueur d'onde de la fluorescence, (5) un détecteur de lumière pour mesurer la fluorescence émise par la résorufine, (6) un module de commande permettant de contrôler le lecteur et (7) une interface utilisateur pour piloter le lecteur.

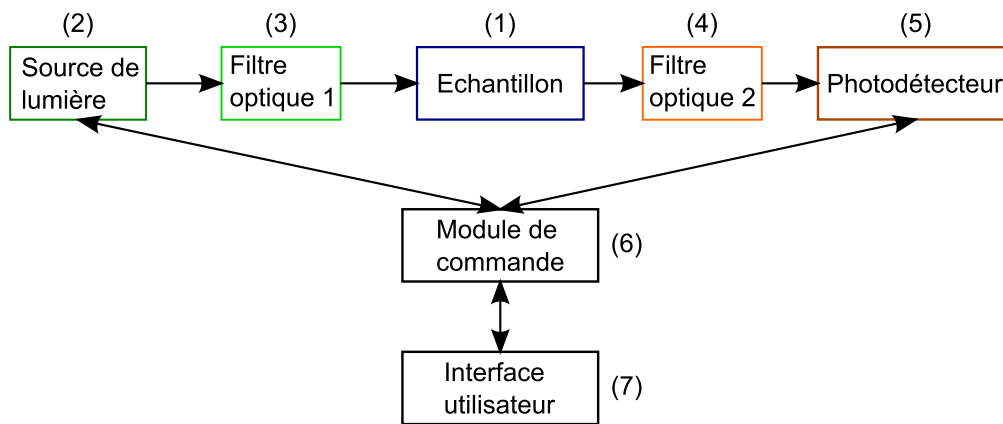


FIGURE 2.19 – Schéma fonctionnel du lecteur de fluorescence.

Deux choix techniques s'offrent à nous pour mesurer la fluorescence sur plusieurs réservoirs. Nous pouvons mesurer la fluorescence, soit un réservoir après l'autre avec une seule source de lumière et un seul détecteur, ce qui nécessite d'utiliser un robot en déplacement XY; soit une source de lumière et un détecteur par réservoir. Les deux méthodes ont leurs avantages et inconvénients. Dans le cas du lecteur unique, la mécanique est plus fragile du fait du déplacement du lecteur, et donc difficilement transportable, au risque d'amener un jeu sur le robot. Dans le cas d'un lecteur par puits, mécaniquement le système est plus robuste, mais on multiplie alors la source et le détecteur par le nombre de réservoirs disponibles, cela peut revenir très onéreux.

Nous avons finalement conçu un lecteur statique, en tenant compte de l'avis de l'ensemble des partenaires du projet. Notre travail consiste alors à choisir judicieusement chaque composant, afin qu'ils aient un très bon rapport performance/prix, car n'oublions pas qu'il s'agit d'un projet de recherche avec une vision industrielle.

Afin de simplifier la conception du lecteur, nous avons choisi de placer au-dessus de la bio-puce la source de lumière avec le filtre d'excitation, et en dessous le photodétecteur avec son filtre d'émission (Figure 2.20).

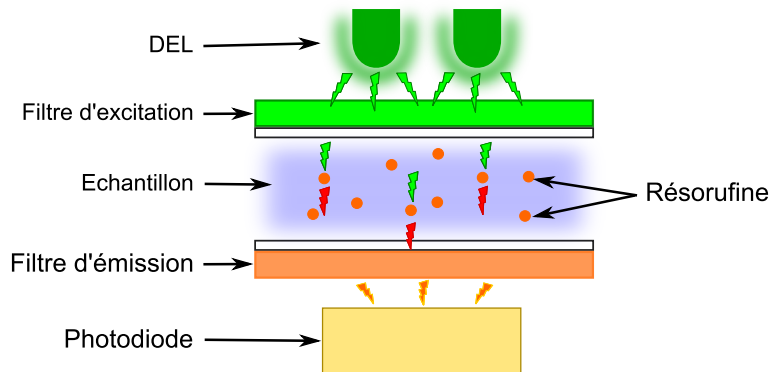


FIGURE 2.20 – Schéma de principe du lecteur de fluorescence.

Les technologies actuelles permettent de créer des LEDs de petites dimensions et puissantes. Elles sont donc tout à fait adaptées à notre application. Tout comme les LEDs, nous pouvons trouver des photodiodes en silicium très sensibles, certaines sont même pré-amplifiées, ce qui leur confère une sensibilité accrue.

Les bio-puces comportent plusieurs réservoirs remplis avec des solutions bio-chimiques différentes. Lors de la mesure de l'un de ces réservoirs, le lecteur ne doit pas mesurer de lumière parasite issue d'un autre réservoir ou de l'extérieur, chaque réservoir doit être parfaitement étanche optiquement pendant les campagnes de mesure. La transparence des matériaux de la bio-puce rend cette contrainte difficile à contourner.

Pour ce qui est de la lumière parasite extérieure, la solution a été de faire réaliser une chambre noire régulée en température.

Pour les signaux optiques provenant des puits contigus, la solution a été de mettre au point un protocole de mesure séquentiel consistant à éclairer les puits l'un après l'autre. Nous devons ainsi réaliser deux modules, l'un comprenant l'ensemble des LEDs et l'autre l'ensemble des photodiodes. Nous prendrons soin de placer correctement les composants en face de chaque réservoir.

Dans l'espoir de développer rapidement le lecteur, nous avons choisi d'utiliser un module de commande générique, qui sera remplacé, in-fine, par une carte de commande spécifique au système. Ce type de module peut se commander par USB via un programme. Nous développerons une interface utilisateur qui sera capable de piloter l'ensemble du système, de fournir les informations mesurées par le lecteur et de les afficher sur une interface graphique.

2.5.2 Gestion du système et de l'environnement de mesure

Comme nous l'avons décrit dans la première partie de ce chapitre, le système de mesure de DBO doit être régulé à 30°C. Nous partons du principe que le système sera toujours placé à un endroit

où la température ne dépassera jamais les 30°C, il n'a donc pas besoin d'être refroidi. Le contrôle de la température est donc simplifié. En effet, un simple élément chauffant associé à un ventilateur permet de réguler et d'homogénéiser correctement la température dans la chambre noire. Un capteur de température est placé au centre de la chambre. Nous devons garder en mémoire que le but final du projet est de proposer un système portable pour effectuer des mesures sur site. De ce fait, la gestion de l'énergie est importante. Il faut donc prévoir une chambre noire possédant une bonne inertie thermique pour éviter à l'élément chauffant de fonctionner en permanence. Une simple paroi en mousse compacte permet de garder une bonne inertie thermique. D'un point de vue isolement optique, il n'y a pas de difficulté particulière, un simple caisson en aluminium remplira ces conditions.

Le système sera géré par le même programme informatique que le lecteur de mesure, il pourra ainsi contrôler chaque électrovanne et chaque pompe du système.

2.6 Conclusion

Ce chapitre a été consacré à la conception d'un système complet de mesure de DBO Bioguard. Nous avons rappelé le cahier des charges, ainsi que les exigences biologiques et instrumentales. Après avoir passé en revue les contraintes et avantages des systèmes « macro » et « micro », nous avons proposé une architecture système et conduit le travail de conception des deux versions ainsi que des capteurs qui leur sont associés.

Nous avons conçu un système « macro » capable de transporter un échantillon vers quatre réservoirs et d'y suivre la dynamique de consommation de l'oxygène dissous. Le système a été conçu pour l'utilisation d'une seule souche bactérienne, injectée en suspension. Les systèmes de régulation thermique et d'étanchéité ont été conçus pour en faire un outil de travail dénué de toute dérive ou incompatibilité.

L'architecture du système fluidique « macro » a été conçue en fonction du type d'actionnement utilisé. Le choix d'un actionnement avec des micro-pompes à solénoïde est un choix permettant d'activer une conception rapide et simple d'un prototype. Nous avons, ainsi, dans une première étape d'étude, conçu un système mono-bactérie afin d'étudier la faisabilité du concept et d'avoir une vision plus réaliste des défis à réaliser en version « micro ».

Le passage vers la conception et l'étude d'une filière technologique a été grandement facilité par les connaissances acquises, ce qui a donné naissance aux premières bio-puces à optodes. Par la suite, nous avons intégré plusieurs micro-réservoirs afin de pouvoir multiplier le nombre de conditions expérimentales par puces. Nous retiendrons de cette conception que la géométrie des réservoirs joue un rôle important dans l'injection des fluides sans bulle d'air, et que la conception dépend grandement du type de capteur utilisé. Nous avons finalement réussi à concevoir des bio-puces simples, rapides à mettre en œuvre et adaptables en fonction du type de capteur utilisé.

3 Procédés technologiques et fabrication

Nous avons, dans le chapitre précédent, conçu deux dispositifs de mesure, l'un « macro » et l'autre « micro », autour de deux types de capteurs optiques : optode et résazurine. Le premier servira à la mesure de l'oxygène dissous dans l'échantillon sous test et le second assurera le suivi de l'activité de biodégradation bactérienne.

Ce chapitre est consacré à la fabrication de ces dispositifs. Nous traiterons, d'abord, de la fabrication du dispositif « macro » automatique, avec ses réservoirs de mesure et les différents éléments électro-fluidiques qui le composent. Puis, nous expliquerons le procédé de fabrication des bio-puces en technologie verre-PDMS. Nous verrons ensuite l'électronique de mesure conçue pour mesurer la fluorescence induite par la réduction de la résazurine. Finalement, nous donnerons le détail de la composition des solutions utilisées pour la culture bactérienne et pour la préparation des échantillons.

3.1 L'automate de mesure en milli-volume

Nous allons décrire, dans cette partie, le système développé permettant une gestion automatisée des fluides, du contrôle de l'environnement de mesure et de la mesure d'oxygène dissout dans des réservoirs milli-volumique.

3.1.1 Fabrication et assemblage des réservoirs milli-volumiques

L'un des objectifs de cette thèse est de montrer la possibilité de réduire le volume des échantillons sans qu'il n'y est d'impact sur la mesure et les résultats. Nous avons pour cela fabriqué des réservoirs de contenance milli-volumique pour avoir une base de comparaison. Nous devons porter une certaine attention au choix des matériaux utilisés. En effet, des bactéries seront en contact avec ces matériaux, ils doivent donc être biocompatibles et non-biodégradables. De plus, la mesure de l'oxygène dissous est réalisée par une optode, cela signifie qu'il y a une interrogation optique de ce capteur à l'aide d'une

Chapitre 3. Procédés technologiques et fabrication

fibre optique. Cela signifie que le matériau choisi doit être transparent et non fluorescent. Nous avons choisis du plexiglass qui servira à fabriquer les parois des réservoirs, et le Teflon qui servira à réaliser le fond et le capot des réservoirs. La fabrication des parois ne peut être réalisée dans la masse par usinage car cela engendrerait une opacité du plexiglass. Elles ont donc été formées par thermo-soudure pour avoir une bonne transparence des parois.

La complexité de ce système vient de l'assemblage des pièces. En effet, différents éléments sont assemblés et doivent assurer une étanchéité parfaite entre eux. Des joints ont été placés entre le haut des parois et le capot, et entre le bas des parois et le socle. L'ensemble est serré à l'aide de tiges filetées pour comprimer les joints et assurer l'étanchéité avec les différentes pièces. Les entrées et sorties fluidiques sont percées dans le socle (Figure 3.1(a) (1)). Des connectiques UpChurch ont été utilisées pour connecter les capillaires venant du gradient de concentration (Figure 3.1(b) (2)) aux réservoirs. Les capillaires utilisés ont un diamètre intérieur de $800\text{ }\mu\text{m}$, et un diamètre extérieur de $1,64\text{ mm}$ (1/16 de pouce). Un trou fin a été percé au-dessus de chaque réservoir permettant ainsi à l'air de s'évacuer lors du remplissage des réservoirs. Les réservoirs ont une contenance de 4 ml.

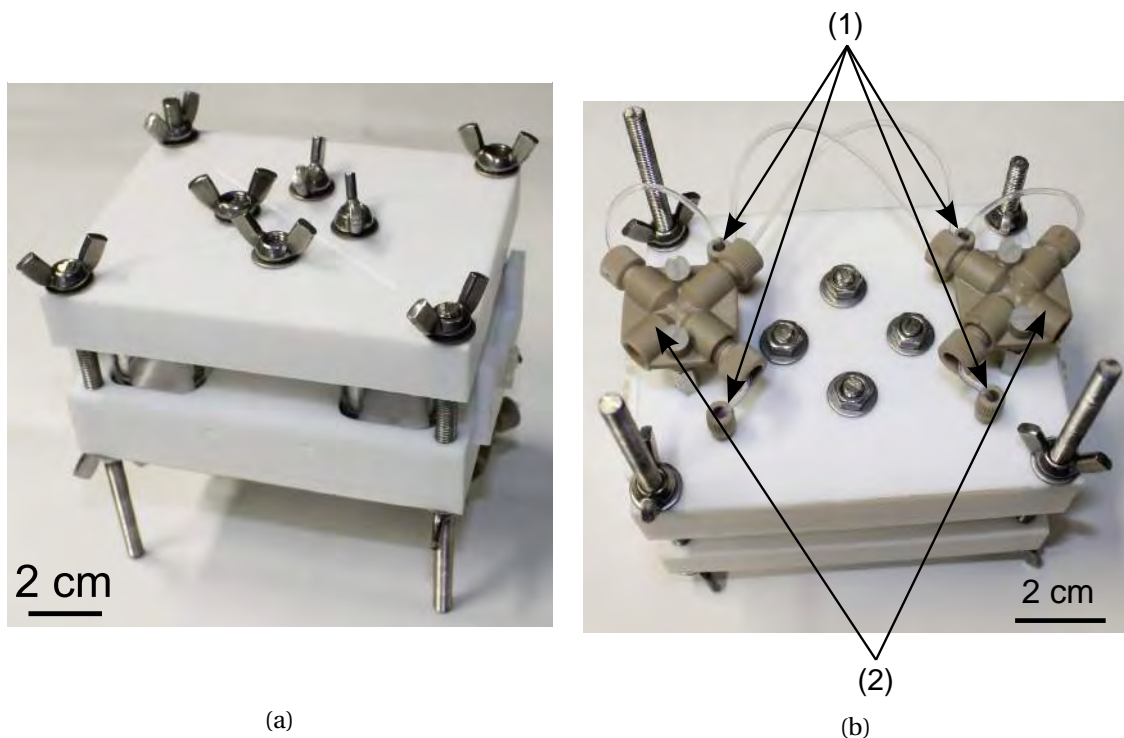


FIGURE 3.1 – (a) Photographie du système « Macro ». (b) Vue de dessous du système avec le gradient de concentration (2).

3.1.2 Intégration du capteur

Les optodes sont collées à l'aide d'une colle silicone transparente sur une face intérieure de chaque réservoir. Les optodes sont placées environ à mi-hauteur des réservoirs. Des supports percés au diamètre de la fibre optique sont fixés sur la base du module « macro » au niveau de chaque optode. Les fibres optiques sont insérées dans leur emplacement jusqu'à toucher la paroi des réservoirs (Figure 3.2).

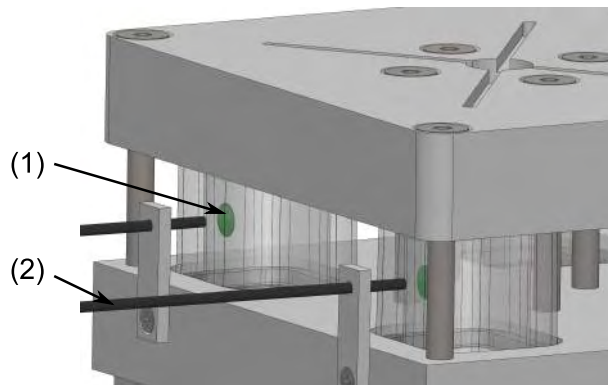


FIGURE 3.2 – Représentation 3D des optodes (1) collées à l'intérieur des puits et sur lesquelles pointent les fibres optiques (2).

3.1.3 Intégration de l'électronique de commande et contrôle de l'environnement

Dans la définition du projet, il a été stipulé que le système doit être portable pour répondre à un besoin ponctuel d'analyse sur site. Après conception du système, nous avons estimé le volume qu'occupent ses différents éléments. Nous avons alors fait le choix d'intégrer le système dans une mallette.

Un caisson en aluminium a été fabriqué dont les parois intérieures ont été recouvertes de plaque de mousse compacte en polyester afin d'isoler l'intérieur thermiquement. Tous les éléments qui composent le système fluidique, les réservoirs et les flacons sont placés à l'intérieur de ce caisson. Tous les fluides sont alors à température constante, et ainsi évitent de stresser le système biologique. De plus cela évite d'avoir de multiples connexions fluidiques ou électriques entre l'intérieur et l'extérieur du caisson.

Le système de régulation thermique choisi est un module JUMO permettant de contrôler un élément chauffant. Cet élément chauffant est associé à un ventilateur favorisant l'homogénéisation de la température dans le caisson par un flux d'air. Une sonde PT1000 placée au centre du caisson permet la mesure de la température.

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre 2, nous allons utiliser une micro-pompe à solénoïde afin de déplacer les fluides. Connaissant le volume de la micro-chambre, nous pouvons savoir précisément

Chapitre 3. Procédés technologiques et fabrication

le volume injecté en comptant simplement le nombre d'activations de la pompe. Nous souhaitons une pompe qui puisse délivrer les solutions dans les quatre réservoirs en 2 min, soit un débit de $133 \mu\text{l/s}$. Le calcul de la longueur totale des canalisations a permis de déterminer la pression minimale nécessaire pour déplacer le liquide. Dans le calcul, nous avons négligé la hauteur d'eau car elle est très faible devant la résistance hydrodynamique des canalisations. Dans ces conditions, nous avons calculé que la pression à fournir pour déplacer le liquide est de 4,46 mbar. Autrement dit, la moindre pression peut déplacer le liquide. Pour répondre à ces conditions, nous avons utilisé une micro-pompe LEE COMPANY – LPLA1251650L. Elle ne permet pas d'atteindre les $133 \mu\text{l/s}$, mais avec son volume de chambre de $50 \mu\text{l}$ elle nous assure une bonne précision sur les volumes injectés. Elle permet d'injecter $50 \mu\text{l}$ par impulsions, et fonctionnant au maximum à 2 Hz, elle peut délivrer un débit de $100 \mu\text{l/s}$ [Lee Company,].

Les électrovannes utilisées sont des LQX12-3W12FF48-000 de la société PARKER [Parker,]. Il s'agit d'électrovannes 3 voies universelles. Cela signifie qu'elles peuvent être utilisées soit en tant que mélangeur (2 entrées – 1 sortie), soit en tant que distributeur (1 entrée – 2 sorties). Nous avons également choisi l'option Manifold afin de pouvoir connecter les capillaires aux électrovannes avec les connectiques UpChurch. Leur volume mort interne est de $32 \mu\text{l}$.

Nous souhaitons réaliser un automate capable de déplacer les fluides, réguler la température, effectuer la mesure et nettoyer le système afin de pouvoir le réutiliser. Pour cela, une carte électronique de commande avec un microcontrôleur a été réalisée. Nous avons également intégré un pupitre de commande pour pouvoir piloter manuellement les différents actionneurs. La figure 3.3 présente une photographie de la mallette, plus précisément de l'intérieur du caisson thermostaté.

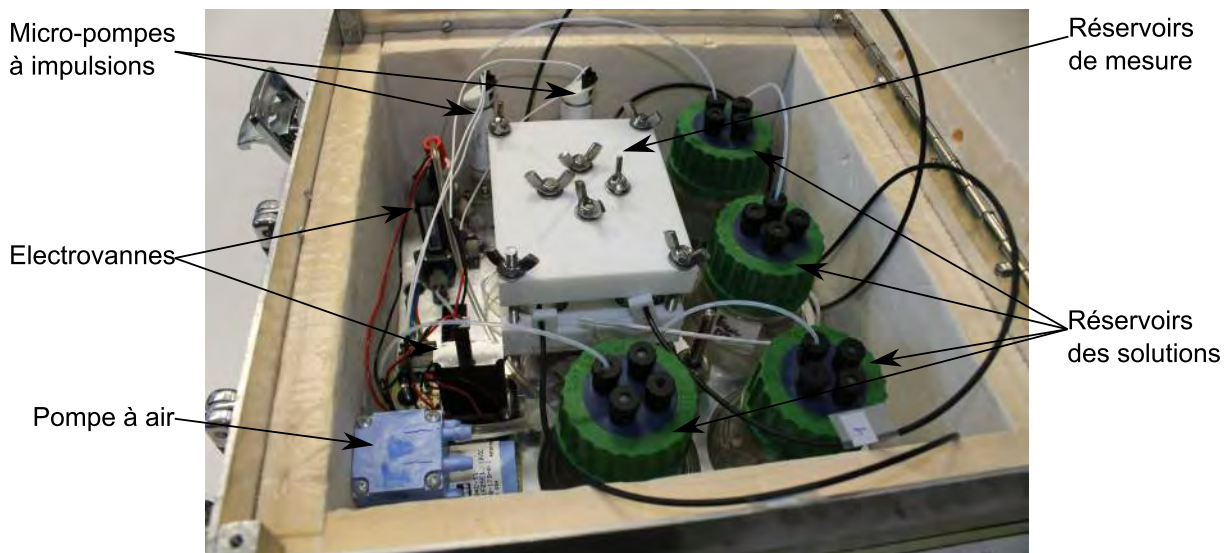


FIGURE 3.3 – Photographie de la mallette comportant les différents éléments d'injection de fluides ainsi que le caisson thermostaté qui doit contenir les bactéries.

3.2 Des biopuces en technologie Verre-PDMS

Cette partie est destinée à décrire le procédé de fabrication permettant de fabriquer des biopuces en technologie verre-PDMS. Nous détaillerons, dans les prochains paragraphes, les différentes étapes de ce procédé.

La biopuce se compose d'une lame de verre pour microscope, de dimensions standards (76 mm × 26 mm), qui supporte une couche de PDMS de 5 mm d'épaisseur dans laquelle nous avons imprimé, par moulage, les réservoirs de mesure et les canalisations. Ces canalisations, de dimensions micrométriques, impliquent l'utilisation des techniques de fabrication de microélectronique en salle blanche. Le moule permettant d'imprimer le PDMS est constitué d'une couche de résine SU8 photogravée sur un support en silicium. Une adaptation du procédé a été mis en place afin d'intégrer un capteur optique dans la bio-puce.

3.2.1 Description des principales étapes de fabrication d'une biopuce

La fabrication de puces microfluidiques nécessite différentes étapes qui demandent, dans la plupart des cas, un espace de travail propre et donc requièrent l'utilisation d'une salle blanche. Nous allons voir, ici, les principales étapes amenant à un dispositif final PDMS-verre.

Le PDMS [Sylgard,] est un matériau transparent, peu fluorescent et se moule avec une grande précision (environ 20 nm [Wang and Lu, 2009]). De plus, ses propriétés élastomériques facilitent les connectiques puisqu'il joue naturellement le rôle de joint.

Pour commencer, nous devons réaliser des masques de photolithographie. Réalisés sur verre ou polymère, ils dessinent à échelle réelle les motifs que nous souhaitons réaliser. Ces masques serviront ensuite à structurer une résine photosensible par un procédé de photolithographie : insolation UV et révélation chimique. Nous avons ainsi réalisé, en SU8 sur silicium, le moule portant l'empreinte des réservoirs et des canalisations. Le motif est ensuite transféré sur PDMS : le polymère liquide est coulé sur le moule, après réticulation il est décollé et percé pour accéder aux canaux microfluidique. Enfin, l'étape ultime du procédé consiste à sceller le microsystème sur la lame de verre pour fermer les canaux. La figure 3.4 représente les étapes de fabrication d'une puce.

3.2.2 Les masques pour la photolithographie

Il existe deux méthodes pour fabriquer des masques qui vont déterminer la qualité finale du micro-système. Chaque conception de microsystème commence par un dessin sur ordinateur des canaux à échelle réelle (Illustrator, Cle-Win).

La plus rapide (quelques heures de réalisation) et la moins coûteuse (<10€) est une impression à l'encre

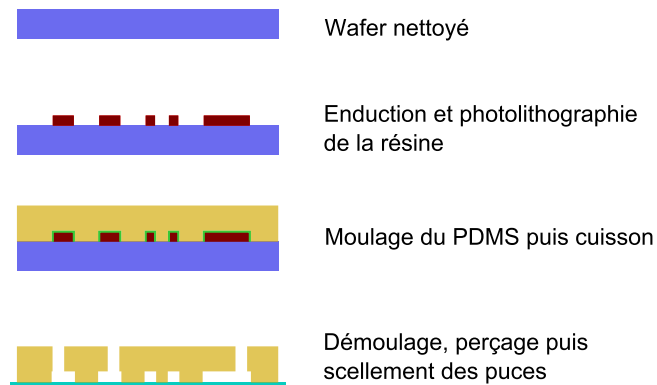


FIGURE 3.4 – Principales étapes de fabrication des puces

noire de ce dessin sur un film transparent à l'aide d'une imprimante à haute définition (>3600dpi, technique d'impression par "flashage"). Avec une telle méthode, il peut être délicat de descendre à des largeurs de canaux inférieurs à $20\ \mu\text{m}$ et les parois ne sont pas complètement perpendiculaires par rapport au substrat.

Avec un masque en chrome, la définition est grandement améliorée, les parois sont pratiquement perpendiculaires mais le coût (300€) et les délais de fabrication (2-3 semaines) deviennent conséquents [Deng et al., 2000, Qin et al., 1996].

Ainsi, au vu des dimensions de nos réservoirs et canalisations calculées en chapitre 2, l'utilisation des masques sur film transparent s'est révélée être le choix le plus judicieux en termes de rapport qualité/prix et de rapidité de fabrication. La photographie de la figure 3.5 en montre un exemple comportant 16 biopuces avec leurs canalisations.

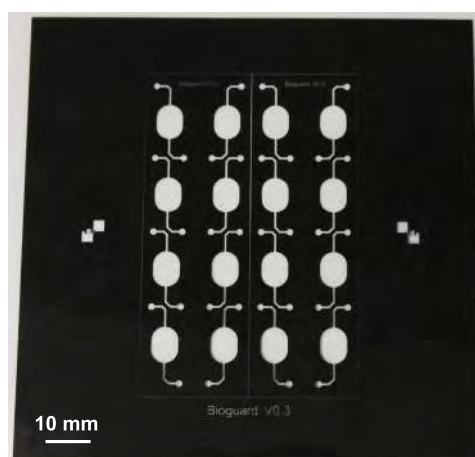


FIGURE 3.5 – Photographie d'un masque sur film transparent comportant les dessins des structures à réaliser en SU8.

3.2.3 Structuration de la SU8 par photolithographie

La photolithographie est une technique standard, très utilisée, de structuration de la matière issue de la micro-électronique. Elle consiste à reporter des motifs sur une résine photosensible déposée sur un substrat (généralement en silicium ou en verre), via un masque. Un procédé complet de photolithographie comprend une préparation du substrat, l'enduction de la résine photosensible, un recuit, l'insolation à travers un masque, un recuit post-insolation et enfin le développement chimique (ou révélation).

3.2.3.1 Préparation du substrat

La première étape du procédé de fabrication consiste à nettoyer le substrat de toute pollution chimique ou organique pour que la résine puisse adhérer correctement à sa surface. Un mélange Piranha (acide sulfurique H_2SO_4 – eau oxygénée H_2O_2 (50/50 v/v)) permet d'enlever tout contaminant organique présent sur le substrat. Le substrat est ensuite plongé dans un bain HF, acide fluorhydrique, afin de retirer la fine couche d'oxyde qui se sera formée.

3.2.3.2 Dépôt de la résine photosensible

La résine est généralement déposée sur un wafer par spin-coating. Cette étape consiste à centrifuger un volume de résine déposé sur un wafer ce qui permet de l'étaler sur ce dernier. L'épaisseur de la résine déposée dépend de ses caractéristiques, notamment de sa viscosité, et des paramètres de rotation : vitesse, accélération et temps de rotation. Un protocole bien adapté permet ainsi d'obtenir des épaisseurs calibrées et reproductibles. Typiquement, dans le cas de la résine SU8, il est possible de déposer jusqu'à $200\ \mu m$ d'épaisseur. Certains travaux ont montré la possibilité d'obtenir des épaisseurs bien plus importantes, 1.2mm [Lorenz et al., 1998], 1.5mm [Lin et al., 2002], ou même 2mm pour un nouveau type de SU8 renommée en SUEX [Rashidian et al., 2013]. Lors de la centrifugation, une certaine quantité de résine est éjectée du wafer dû aux forces inertielles. Pour la fabrication de couche de forte épaisseur ($>200\ \mu m$), des enductions successives sont réalisées afin d'arriver à l'épaisseur souhaitée et uniformément déposée. A chaque enduction, il y a une perte de la résine, la méthode est en soit efficace mais peu économique.

Le wafer peut également être enduit par dépôt gravitaire. Cette technique consiste à déposer la quantité de résine juste nécessaire pour obtenir l'épaisseur souhaitée et la laisser s'étaler d'elle-même. Le fait de laisser le wafer enduit de résine à basse température ($50^\circ C$) pendant quelques minutes avant le recuit permet de fluidifier la résine et ainsi faciliter son étalement. Par cette technique nous obtenons une épaisseur bien contrôlée et sans perte de résine.

3.2.3.3 Premier recuit (soft-bake)

Immédiatement après le dépôt de la résine, le wafer est chauffé pendant un temps dépendant de l'épaisseur déposée afin de faire évaporer le solvant contenue dans la résine et avoir une couche solide. Afin de minimiser les contraintes mécaniques, le wafer est chauffé suivant une rampe de température (Figure 3.6). Lors des dépôts multicouches, un soft-bake est réalisé après chaque dépôt. Dans le cas d'un dépôt gravitaire, il n'y a qu'un seul soft-bake, mais plus long.

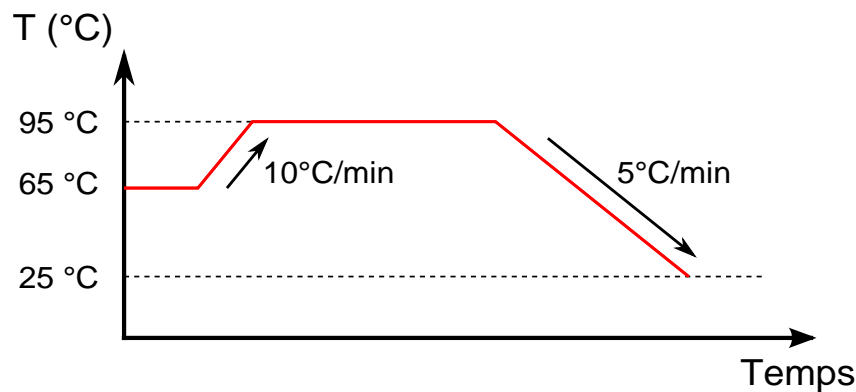


FIGURE 3.6 – Exemple d'un programme de Soft-bake

3.2.3.4 Insolation de la résine

La résine est ensuite insolée par une source UV à travers un masque. La dose d'UV permet d'initier la réticulation de la résine. Le temps d'insolation dépend de l'épaisseur de la résine et de l'équipement utilisé. L'insolation se fait à une longueur d'onde de 365 nm.

3.2.3.5 Post-exposure bake

La résine est à nouveau recuite. Cette étape, appelée post-exposure bake (PEB), a pour effet d'accélérer la réticulation de la résine. Tout comme le soft bake, le PEB suit une rampe de température, pour permettre à la résine de s'adapter progressivement, à l'échelle moléculaire, aux contraintes induites par le changement de température.

3.2.3.6 Développement

Une fois la résine insolée, elle est révélée à l'aide d'un photo-développeur qui permet d'enlever la partie non durcie durant l'insolation et le PEB. Plus les structures sont fines et hautes, plus il faut du temps. Un rinçage à l'isopropanol permet de stopper le processus de développement et de vérifier la présence de résine résiduelle par des traînées blanches.

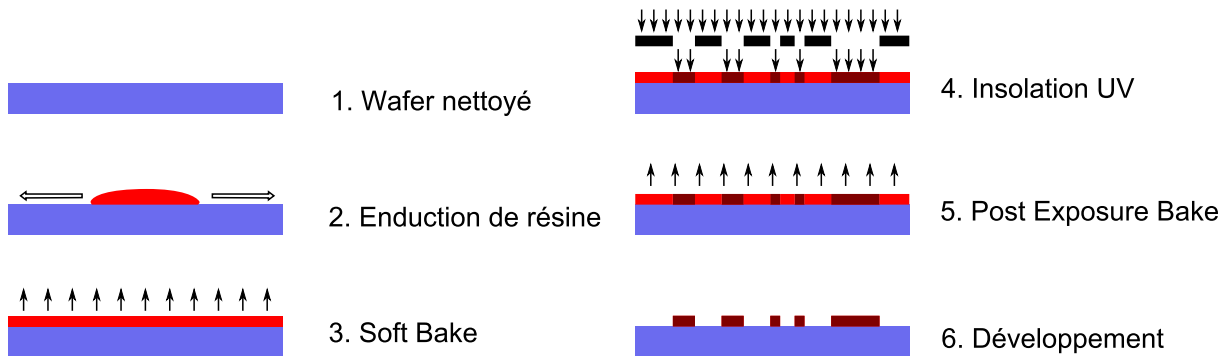


FIGURE 3.7 – Résumé des étapes de structuration d'une résine négative

3.2.4 Fabrication des dispositifs en PDMS d'épaisseur contrôlée

Une exigence de la mesure de fluorescence, que ce soit pour les optodes ou la résorufine, est que le matériau soit optiquement transparent et faiblement fluorescent. Cela implique de réaliser des puces dont l'épaisseur est constante afin de limiter le risque de dispersion de la mesure, causée par une variation de son épaisseur. Nous allons nous intéresser dans un premier temps au protocole opératoire de la préparation du PDMS, puis nous verrons comment nous avons obtenu des dispositifs ayant une épaisseur définie.

Avant de préparer le PDMS, le moule en SU8 doit être rendu hydrophobe par une étape de silanisation. C'est à dire que sa surface est fonctionnalisée à l'aide d'un silane afin de la rendre antiadhésive. Le but de cette étape est d'éviter que le PDMS ne se lie au moule en silicium-SU8 lors de l'étape de cuisson. Pour la fabrication de nos puces, nous avons utilisé de l'OTS (OctaDecylTrichloroSilane) pour fonctionnaliser les surfaces du moule. Le procédé consiste à plonger le wafer dans une solution de Xylène contenant de l'OTS sous une atmosphère d'azote afin d'éviter la polymérisation du silane pendant 5 min. Le wafer est ensuite rincé dans trois baignoires de solvant successifs, d'abord dans du xylène, puis de l'acétone et enfin dans l'éthanol. Le wafer est laissé 3 minutes dans chaque baignoire. Un passage du wafer sous un filet d'eau permet de vérifier si la silanisation a fonctionné. Enfin, le wafer est séché par un flux d'azote. Le PDMS est ensuite préparé en mélangeant le monomère et l'agent réticulant avec un ratio de 10 :1 en masse (pour 40 gr. de monomère de PDMS, il faut 4 gr. d'agent réticulant). Une fois le mélange effectué, il est mis sous vide afin de le faire dégazer pour éviter la formation de bulles d'air lors du processus de fabrication.

Afin de maintenir une épaisseur constante des puces, nous avons réalisé un support en aluminium dans lequel nous avons coulé le PDMS (Figure 3.8). Ce support est composé de trois pièces : une pièce centrale qui définit l'épaisseur finale du dispositif PDMS (5 mm), d'un côté une pièce contre laquelle le moule en SU8 est pris en étau contre la pièce centrale, et de l'autre côté un wafer en verre de 1 mm est pris en étau entre la pièce centrale et une pièce dont le centre est dégagé afin de visualiser le PDMS que l'on coule. Avant de couler le PDMS, le wafer en verre est également traité à l'OTS. Enfin, l'ensemble

est mis au four, à 80°C pendant 1h30, afin de permettre au PDMS de réticuler.

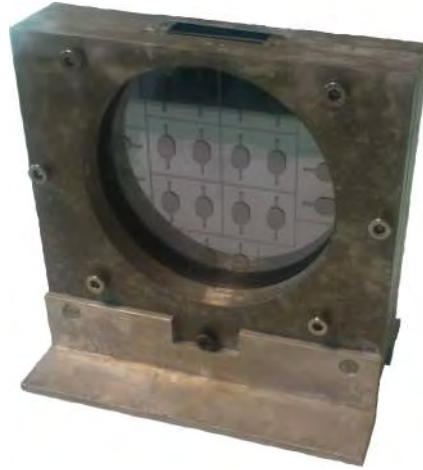


FIGURE 3.8 – Support aluminium permettant de mouler le PDMS sur les structures en SU8.

3.2.5 L'étape d'assemblage des puces

Cette dernière étape consiste à fermer les canaux réalisés sur un wafer ou sur tout autre support. Le choix des matériaux, du capot et celui empreint des canaux, fixe la technique de scellement à utiliser.

3.2.5.1 Intégration de l'optode et assemblage

Comme nous l'avons expliqué dans la partie conception, afin de faciliter l'intégration de l'optode dans la puce, nous l'avons fixée sur le capot de la puce. Nous avons utilisé du verre pour former le capot pour plusieurs raisons, pour sa rigidité, sa transparence et sa compatibilité avec les techniques de photolithographie classiques.

Le procédé permettant de réaliser les capots en verre où sont encastrées les optodes est identique à celui utilisé pour la fabrication des moules en SU8. Un wafer de verre de 1 mm est nettoyé par piranha puis fonctionnalisé par un plasma O₂. Une couche de SU8 de 200 μm est déposée par spincoating, puis photolithographiée afin de réaliser les connexions fluidiques et l'emplacement pour l'optode. Puis un film sec est laminé sur les deux faces du wafer, ces couches vont permettre de protéger la résine durant le perçage du verre. Cette dernière opération se fera à l'aide d'une sableuse afin de réaliser les trous servant aux connexions fluidiques. Le wafer est ensuite nettoyé par bain successif dans l'acétone, l'éthanol et dans l'eau déionisée. L'optode est ensuite collée sur le wafer à l'aide d'une colle silicone. L'ensemble des étapes est résumé sur la figure 3.9.

Les photographies de la Figure 3.10 montrent respectivement (a) le capot muni de l'optode et (b) la partie basse contenant un réservoir et les canaux fluidiques.

3.2. Des biopuces en technologie Verre-PDMS

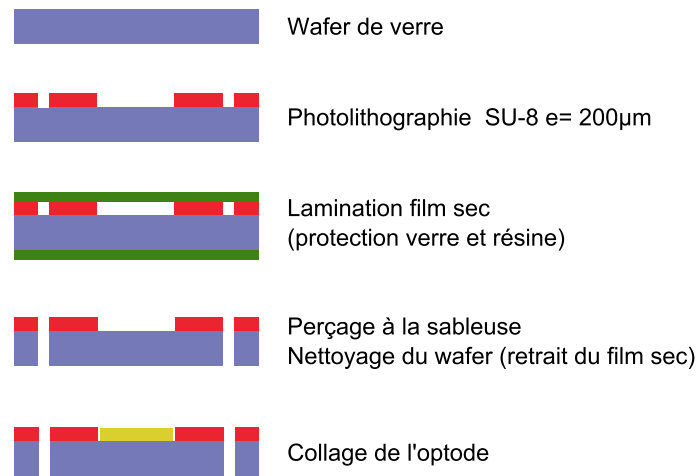


FIGURE 3.9 – Etapes de fabrication de la partie 'capot' des bioMEMS



FIGURE 3.10 – Photographies du capot (a) et de la structure fluidique en PDMS (b)

Le bioMEMS complet sera obtenu par l'assemblage des deux parties. Sachant que l'optode est un composant non compatible avec les techniques de collage classique, notamment avec le plasma O_2 car l'optode contient une molécule sensible à l'oxygène, un plasma O_2 pourrait alors détériorer l'optode. Nous avons donc décidé d'utiliser les propriétés élastomériques du PDMS pour réaliser l'étanchéité de nos canalisations. En effet, nous allons placer la structure en PDMS entre deux lames de verre que nous pressons afin de déformer le PDMS. La deuxième lame de verre permet une meilleure répartition sur l'ensemble de la puce microfluidique (Figure 3.11). Cette méthode permet, en plus, d'avoir un assemblage démontable et facile à mettre en œuvre.

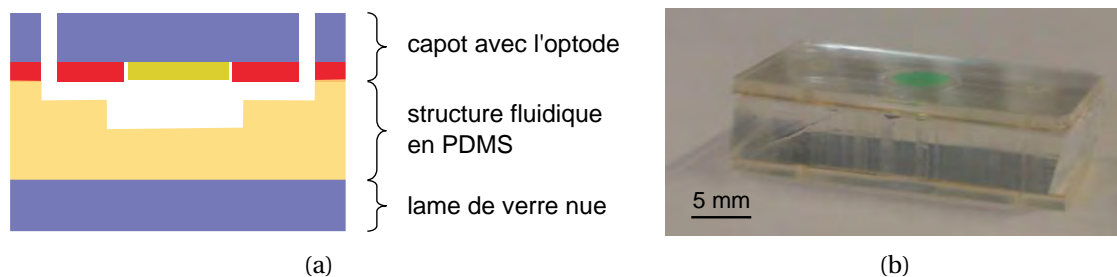


FIGURE 3.11 – (a) Schéma de la puce assemblée, (b) photographie de la puce

Chapitre 3. Procédés technologiques et fabrication

Pour réaliser cet assemblage, il a été nécessaire de réaliser un support permettant de presser le PDMS, d'assurer les connexions fluidiques, la mesure de l'optode par une fibre optique et l'observation de la puce à l'aide d'un microscope. Le premier élément conçu est le bâti, il permet de positionner les différents éléments de la puce, et de réaliser sa visualisation à l'aide d'une ouverture (Figure 3.12(a)). Les deux ailettes sur le côté sont prévues pour fixer des éléments chauffants et ainsi réguler la température du support. Une deuxième pièce est montée sur le bâti afin de permettre l'étanchéité des puces par compression du PDMS (Figure 3.12(b)). Cette puce intègre également deux joints toriques et des pas de vis permettant l'utilisation des connexions Up-Church et ainsi de connecter facilement le système au contrôleur des écoulements. Le trou central rend possible le passage de la fibre optique nécessaire à la mesure de la concentration d'oxygène par l'optode. Des photographies et des schémas décrivant l'assemblage du système sont montrés en figure 3.13.

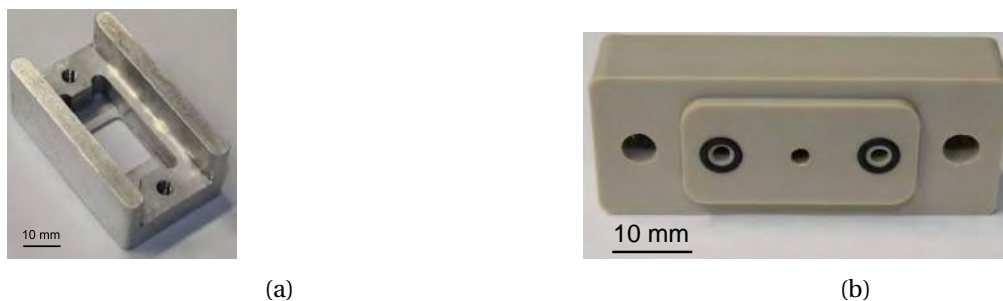


FIGURE 3.12 – Photographies du bâti (a) et du haut du support (b) permettant de maintenir la puce

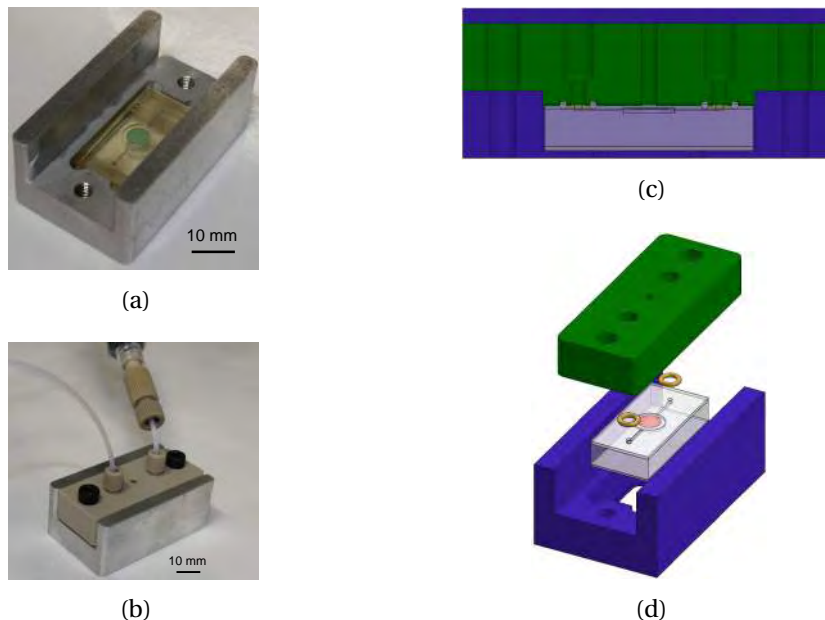


FIGURE 3.13 – Photographie d'une puce placée dans le support (a), assemblage du système avec les connexions fluidiques (b), schéma montrant une vue en coupe (b) et une vue éclatée (c) du système.

3.2.5.2 Cas de la résazurine

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, nous avons utilisé les spécificités de la résazurine pour en faire un indicateur, en lieu et place des optodes, de la consommation d'oxygène par les bactéries. Les molécules peuvent se présenter sous la forme de poudre ou bien en solution. Nous avons opté pour la résazurine en solution, ce qui simplifie grandement le dispositif par rapport à l'usage d'une optode. En effet, nous n'avons ainsi pas besoin d'encastrer ce capteur dans le capot. Cela rend donc le scellement beaucoup plus simple. Nous avons alors opté pour un scellement irréversible du PDMS sur la lame de verre de microscopie (76x26 mm², épaisseur 1 mm).

Le PDMS une fois réticulé dans le support en aluminium (section 3.2.4) est démoulé. Les dispositifs sont ensuite découpés et les connexions fluidiques sont réalisées par perçage à l'emporte-pièce. Un nettoyage des surfaces des lames de verre et des dispositifs PDMS est réalisé dans un bain d'isopropanol, sous ultrasons, pendant 5 min. Les pièces sont ensuite séchées avec un flux d'azote puis mises à déshydrater dans une étuve à 80°C pendant 20 min. Les surfaces des différentes pièces sont ensuite exposées à un plasma O₂ (200 W, 30 s, débit d'O₂ 1000 ml/min). Cette exposition permet la création de fonctions *Si-OH* à la surface du verre et du PDMS. L'utilisation d'un plasma oxygène de paillasse (60W, 2 min, pression d'O₂ 0,5 mbar) est également possible. La mise en contact des surfaces fonctionnalisées, suivie d'un passage à l'étuve pendant 20 min à 80°C, conduit à la création d'un collage irréversible via la formation des liaisons *Si-O-Si* [McDonald et al., 2000]. La figure 3.14, ci-après, résume les étapes de fabrication.

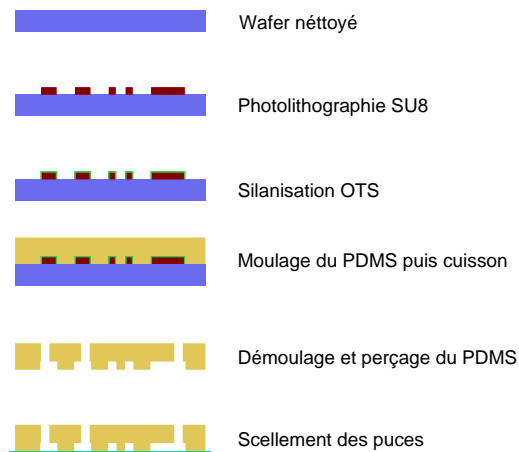


FIGURE 3.14 – Les étapes de fabrication des puces en PDMS

3.3 Réalisation d'un banc expérimental pour la mesure de fluorescence de la résorufine

Dans cette partie, nous allons décrire le banc expérimental que nous avons développé pour le suivi du processus de transformation de résazurine en résorufine par la présence de matière organique dans l'eau. Nous verrons dans un premier temps, comment nous avons intégré les puces au sein d'un système de lecture optique développé dans l'objectif d'exciter les molécules de résorufine et de mesurer la fluorescence émise. Puis nous donnerons quelques indications sur les interfaces fluidiques envisageables, et celle que nous avons adoptée pour nos expérimentations. Enfin nous expliquerons succinctement le programme informatique mis au point par nos soins pour piloter le système et mesurer la fluorescence de la résorufine.

3.3.1 Le système de lecture optique

Nous l'avons vu dans le chapitre 2, nous souhaitons réaliser un système de mesure peu coûteux. Pour cela, des diodes électroluminescentes (LED) seront utilisées pour exciter les molécules de résorufine. Des photodiodes mesureront la fluorescence émise par la résorufine. Sachant que les pics d'excitation et d'émission de la résorufine sont relativement proches, un jeu de filtres en excitation (LEDs) et en émission (photodiode) est donc nécessaire. Ces filtres sont donc nécessaires pour éviter de saturer le détecteur avec la source lumineuse, mais également pour rejeter la lumière ambiante.

Classiquement, dans les systèmes de lecture nécessitant à la fois une excitation et une lecture, la source et le capteur sont placés côte-à-côte avec la cible au-dessus (par exemple : les lecteurs microplaques). Bien que cette architecture a l'avantage d'avoir la source et le capteur au plus proche de la cible, nous pouvons y trouver certains inconvénients. Par exemple, le système doit être parfaitement isolé optiquement entre la source et le détecteur. Ce qui rend l'intégration des composants, dans le système, complexe.

Dans notre système de lecture, nous avons choisi de mettre la source et le détecteur face à face, avec la cible (la puce) entre les deux. Un jeu de filtres placés à la fois sur la source et sur la détection permet de filtrer la lumière reçue par le détecteur à la longueur d'onde souhaitée. De plus, une conception en sandwich simplifie grandement l'architecture du système.

Deux cartes ont été réalisées, l'une sur laquelle les LEDs ont été montées, que l'on nommera module LED, et l'autre recevant les photodiodes, dénommée module photodiode. Nous décrirons dans le paragraphe suivant le choix des LEDs et des photodiodes ainsi que leurs caractéristiques.

La figure 3.15 montre une vue éclatée en trois dimensions du système réalisé. (I) module LEDs, (II) filtres optiques pour les LEDs, (III) support des filtres optiques pour les LEDs, (IV) puces micro-fluidiques, (V) filtres optiques pour les photodiodes, (VI) support mécanique servant à maintenir

3.3. Réalisation d'un banc expérimental pour la mesure de fluorescence de la résorufine

l'ensemble et à recevoir les filtres, (VII) module photodiodes.

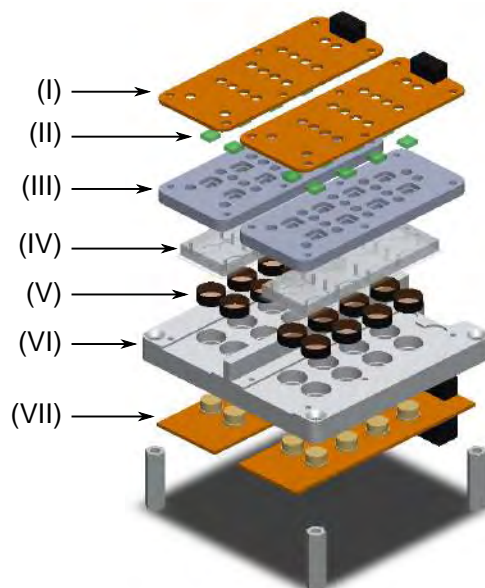


FIGURE 3.15 – Vue éclatée en 3D du système de mesure de la fluorescence

Les différentes parties du système effectivement réalisé sont exposées en figure 3.16. Sur la photographie (a) sont présentés deux modules photodiodes, avec sur la gauche de la photographie les limandes qui permettent de les connecter aux modules LED (b). La photographie (b) présente les deux faces du module LED, à gauche face composant vers le haut et à droite face LED vers le bas. Nous distinguons les trous de passage des connexions fluidiques. Enfin, sur la photographie (c) le montage complet est exposé. Les modules photodiodes sont montés sous le support mécanique (à droite sur la photo), avec sur une moitié du support des filtres d'émission placés au-dessus des photodiodes. Sur la partie gauche, nous apercevons les modules LEDs connectés aux modules photodiodes. Sur la partie basse, les filtres d'excitation sont présentés sur leur support.

3.3.2 Sélection et caractérisation des composants

Les fluorophores sont des substances chimiques capables d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation optique. Les fluorophores, en absorbance, sont sensibles à la lumière sur une gamme de longueur d'onde, celle-ci peut varier en fonction du fluorophore. Ils ont tous, cependant, une absorption maximale à une certaine longueur d'onde. Tout comme pour l'absorbance, le fluorophore émet une lumière de fluorescence sur une gamme de longueur, et possède également un pic de fluorescence à une certaine longueur d'onde qui est généralement très proche du pic d'absorbance.

Pour la résorufine, les pics d'absorbance et d'émission sont respectivement de 571 nm et 584 nm. Comme on peut le voir sur les graphes de la figure 3.17, le choix des différents composants d'émis-

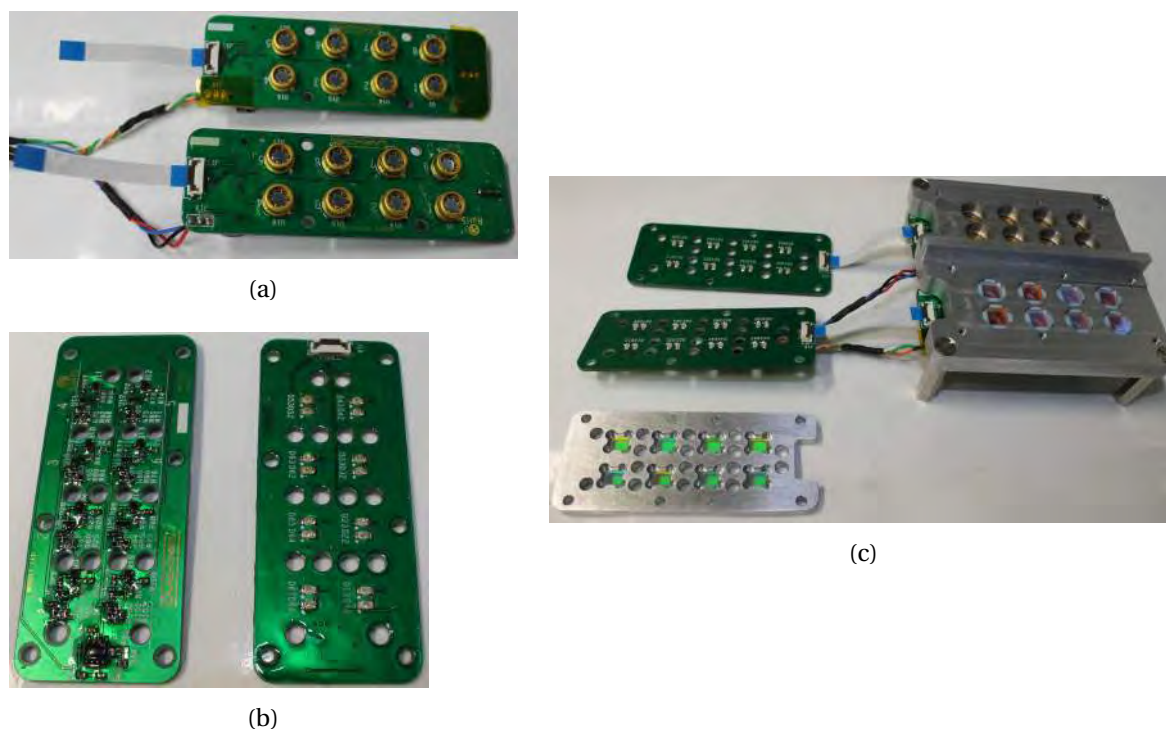


FIGURE 3.16 – Photographies des différents éléments du système d'excitation/lecture optique : deux modules photodiodes (a), de deux modules LED (b) et l'assemblage complet du lecteur de fluorescence (c) avec en bas à gauche le support des filtres d'excitation et sur le support mécanique les filtres d'émission.

sion/lecture optiques (LEDs, photodiodes et filtres) sera difficile. En effet, les spectres de la source de lumière et du détecteur ne doivent pas se recouvrir.

Après plusieurs essais, nous avons choisi des LEDs OSRAM LTN91E [OSRAM,], dont le pic d'intensité est à 530 nm. Concernant le détecteur, un grand nombre de photodiodes plus ou moins sensibles existent. Les photodiodes en silicium ont un spectre de sensibilité étendu dans le visible et permettent donc de mesurer dans la gamme de la résorufine. Notre choix s'est porté sur la photodiode OPT301 [Texas Instrument,] de la société Texas Instruments. Elle intègre une pré-amplification, ce qui lui permet d'atteindre une sensibilité de $0,47 \text{ V}/\mu\text{W}$ à 650 nm.

Par ailleurs, l'utilisation de filtres permet de ne laisser passer que les longueurs d'ondes d'intérêts, émises par les LEDs ou reçues par les photodiodes. Au vu de la proximité des deux pics de la résorufine, les filtres doivent avoir une fréquence de coupure très raide afin qu'il n'y est pas de recouvrement des deux spectres. Des filtres de microscopie ont été utilisés pour leur grande transmittance et leur sélectivité des longueurs d'ondes. Nous avons utilisé le filtre FF01-542 en excitation et le filtre BLP01-568R en émission (Semrock). A des fins de comparaison/sélection, nous avons également reporté sur la figure 3.17 les spectres d'absorbance (courbe rouge) et d'émission (courbe verte) de la résorufine

3.3. Réalisation d'un banc expérimental pour la mesure de fluorescence de la résorufine

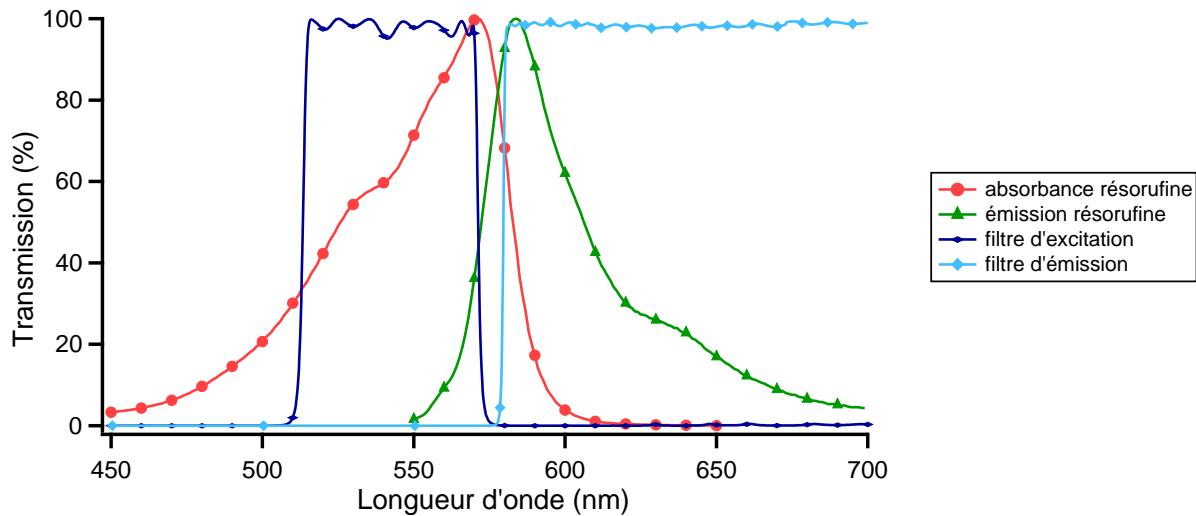


FIGURE 3.17 – Graphes représentant respectivement les spectres d'absorbance et d'émission de la résorufine ainsi que les fenêtres de transmittance des filtres en excitation et en émission. *Données tirées de la documentation fournie par les fabricants*

ainsi que la bande passante théorique des filtres en excitation (courbe bleu foncé) et en émission (courbe bleu clair).

Les fabricants de composants, que ce soit pour de l'optique ou de l'électronique, fournissent les caractéristiques techniques de ceux-ci, cependant ils n'indiquent pas dans quelles conditions ils effectuent les mesures. Ceci est d'autant plus vrai pour des composants optiques tels que des LEDs, des photodiodes, et surtout des filtres optiques.

Nous avons donc caractérisé chaque composant optique dans le spectre visible à l'aide d'un banc de mesure optique afin de connaître précisément leurs caractéristiques. Le banc se compose d'une source de lumière à lampe au Xénon avec un monochromateur pour sélectionner la longueur d'onde, d'une série de miroir et de lentilles convergentes afin de paralléliser le faisceau. Le faisceau entre ensuite dans un monochromateur pour sélectionner la longueur d'onde et est ensuite mesuré par le détecteur en sortie du monochromateur.

Pour caractériser les LEDs, nous avons simplement remplacé la source de lumière à lampe au Xénon par nos LEDs (Figure (a)). La caractérisation des photodiodes a nécessité l'autre partie du banc. C'est-à-dire, de la source de lumière avec le monochromateur, les miroirs et lentilles permettant de focaliser le faisceau sur la photodiode placée en aval (Figure (b)). Nous avons relevé la tension délivrée par la photodiode à l'aide d'un voltmètre pour différentes longueurs d'onde sélectionnée par le monochromateur. Enfin, la caractérisation des filtres a nécessité l'ensemble du banc de mesure. Les filtres ont été placés sur le trajet du faisceau lumineux entre les lentilles convergentes et l'entrée du monochromateur de mesure (Figure (c)).

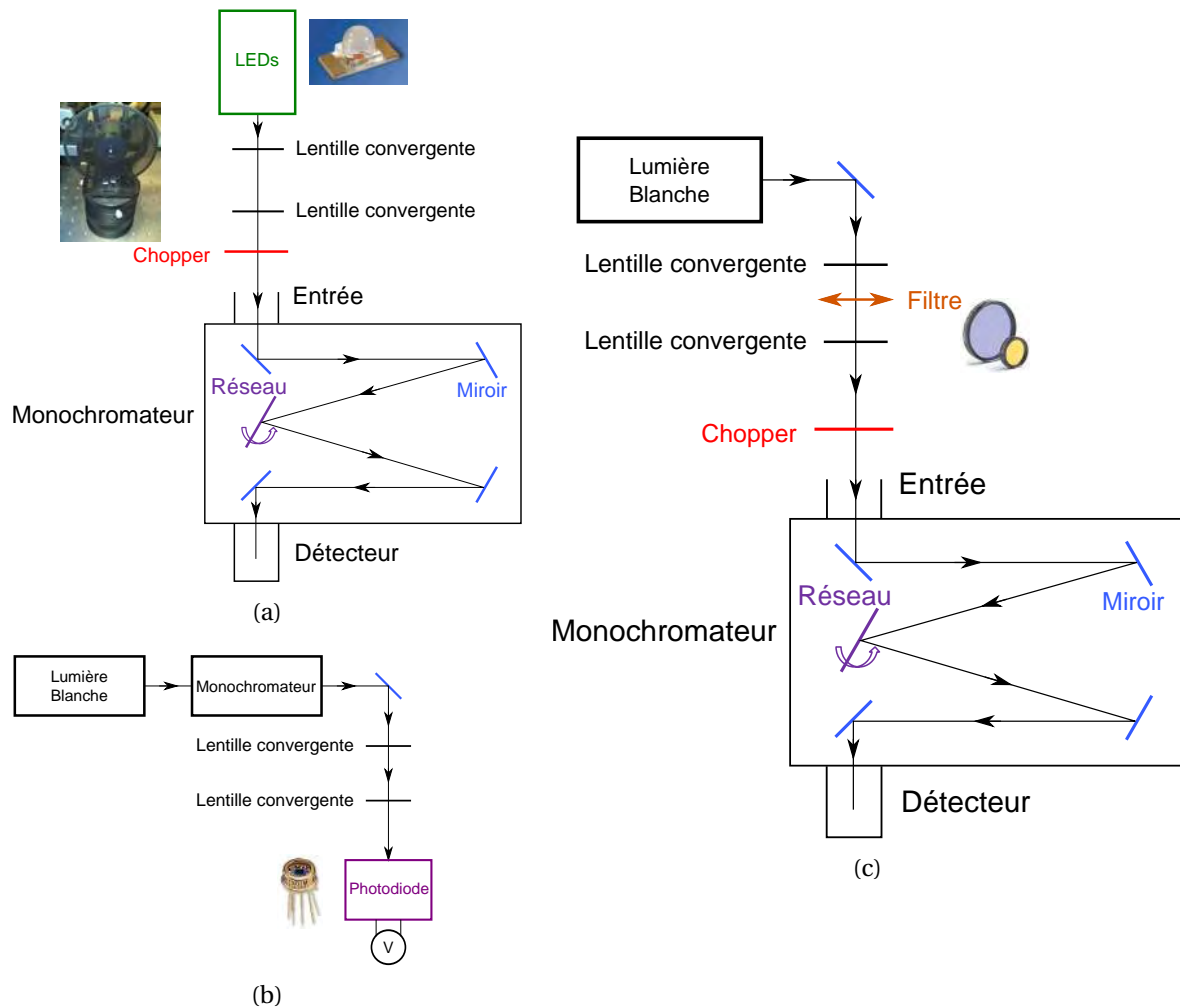


FIGURE 3.18 – Schéma du banc optique pour la caractérisation des LEDs (a), des photodiodes (b) et des filtres (c).

Après traitement des données relevées par le banc optique, nous nous sommes aperçus qu'il y avait un décalage des caractéristiques fournies par le constructeur (Figure 3.17) et nos propres mesures (Figure 3.19).

Les résultats montrent que la transmittance dans la bande passante reste très satisfaisante, 91,5 % mesurée contre 99 % donnée par le constructeur. La bande passante à mi-hauteur est également correcte, 58,3 nm mesurée contre 56,8 théorique. Cependant les fronts de coupures ne sont pas aussi raides que spécifié par le constructeur. Ceci engendre un chevauchement des bandes passantes des filtres autour de 573 nm. A cette longueur d'onde là, la lumière émise par les LEDs traverse les deux filtres et est mesurée par la photodiode.

Nous avons également caractérisé les LEDs et les photodiodes dans le spectre visible, en termes d'intensité relative de lumière en fonction des longueurs d'onde. Les résultats sont regroupés en figure

3.3. Réalisation d'un banc expérimental pour la mesure de fluorescence de la résorufine

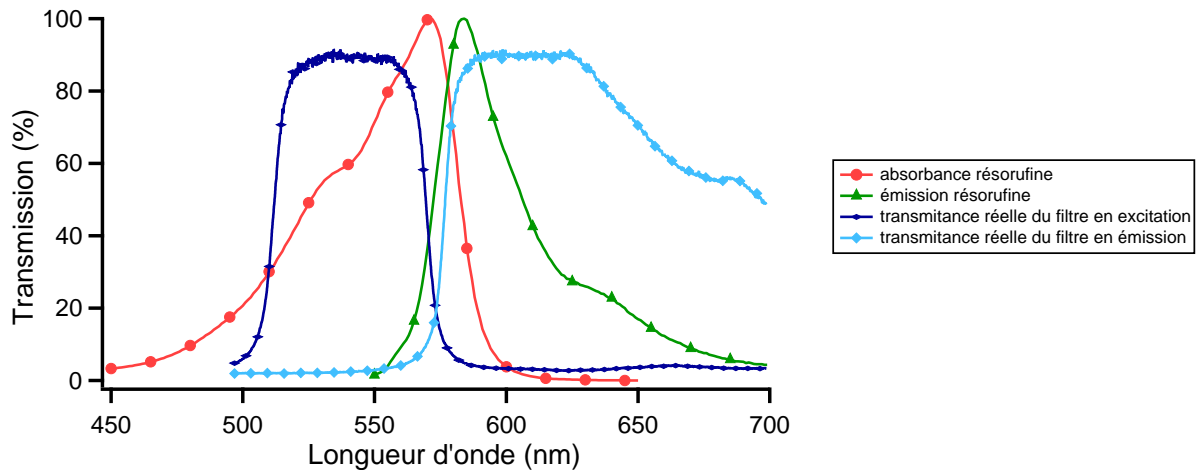


FIGURE 3.19 – Spectre d'absorbance et d'émission de la résorufine, transmittance réelle des filtres en excitation et en émission mesurée par un banc optique. Les mesures ont été effectuées sur le banc expérimental décrit ci-dessus.

3.20. Les courbes d'intensité relative montrent, entre autres, que les photodiodes recueillent plus de 90% des signaux émis par la résorufine à 584 nm mais également d'autres signaux qui pourraient parasiter les mesures.

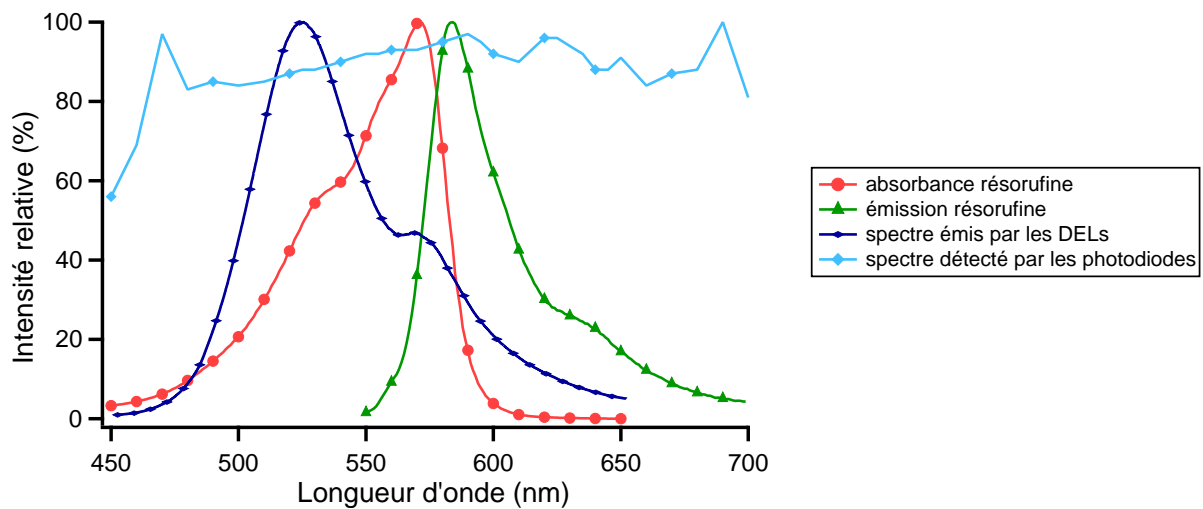


FIGURE 3.20 – Spectre d'émission des LEDs et spectre détecté par les photodiodes.

En interposant des filtres d'excitation et d'émission, nous observons, en figure 3.21, que les courbes d'intensité relative émises par les LEDs et observées en sortie du filtre d'excitation, ainsi que celles détectées par les photodiodes après filtration sont plus sélectives et centrées sur les longueurs d'onde qui nous intéressent.

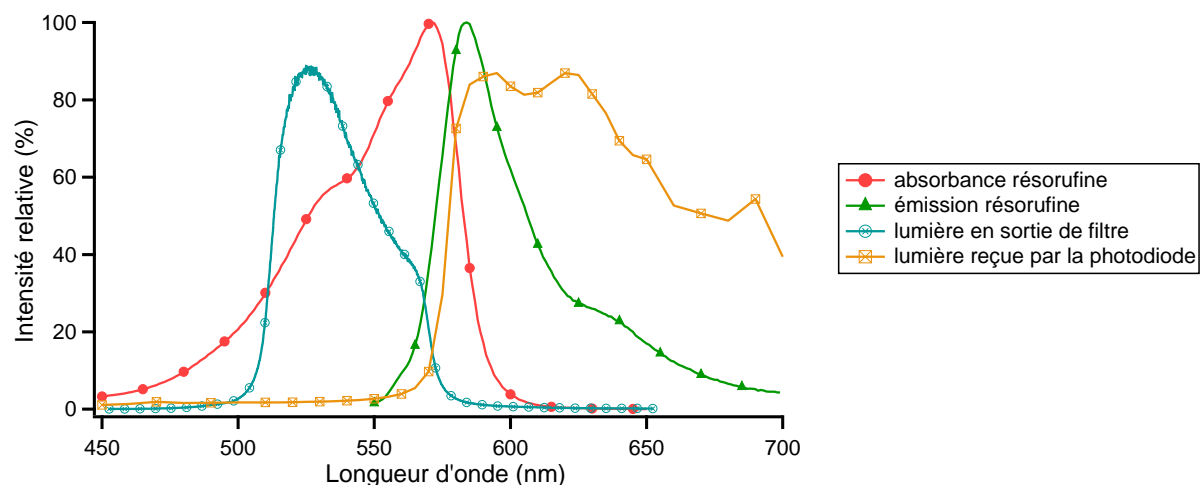


FIGURE 3.21 – Spectre émis par les LEDs après filtration et spectre détecté par les photodiodes après filtration.

3.3.3 Connexions fluidiques

Contrairement aux puces intégrant une optode, les connexions fluidiques sont réalisées au travers du PDMS pour des raisons de simplification du procédé de fabrication. La déformabilité du PDMS nous a permis d'insérer en force un tube dans un trou de diamètre adéquat, cela suffit à assurer l'étanchéité de la connexion pour des pressions de l'ordre de quelques bars. L'utilisation d'un emporte-pièce permet de réaliser des trous adaptés à nos tubes. La procédure de perçage est simple, l'emporte-pièce est enfoncé dans le PDMS à l'endroit prévu pour la connexion, la carotte de PDMS est alors éjectée, puis l'emporte-pièce est retiré. Des tubes capillaires de diamètre extérieur de 1,61 mm peuvent être utilisés pour la connexion fluidique entre la puce et le système fluidique.

Dans le cadre de nos expérimentations sur la résazurine, le système fluidique employé précédemment avec les puces intégrant une optode n'a pas été utilisé. Nous avons alors utilisé, simplement des cônes de pipettes de 1 ml que nous avons plantés dans les entrées et sorties du PDMS pour faire office de réservoir. La capillarité suffit au déplacement des fluides du réservoir vers la puce microfluidique. Dans un cas comme dans l'autre, un emporte-pièce de diamètre 1,2 mm permet de réaliser des trous étanchent avec les deux types de connexions.

3.3.4 Électronique et programme de commande

Chaque réservoir de la puce est éclairé par deux LEDs. Une LED émet un flux lumineux proportionnel au courant qui la traverse. De ce fait, la moindre variation de courant entraîne une variation de la lumière émise et par réactions successives, une variation de fluorescence de la résorufine. Le circuit de commande des LEDs a donc été conçu avec une régulation de courant (Figure (a)), assurant ainsi la

3.3. Réalisation d'un banc expérimental pour la mesure de fluorescence de la résorufine

stabilité du courant traversant les LEDs. Une tension de consigne permet de fixer la valeur du courant de toutes les LEDs entre 0 et 25 mA. Une commande logique (0 ou 1) permet l'activation ou non de chaque couple de LEDs (Figure (b)).

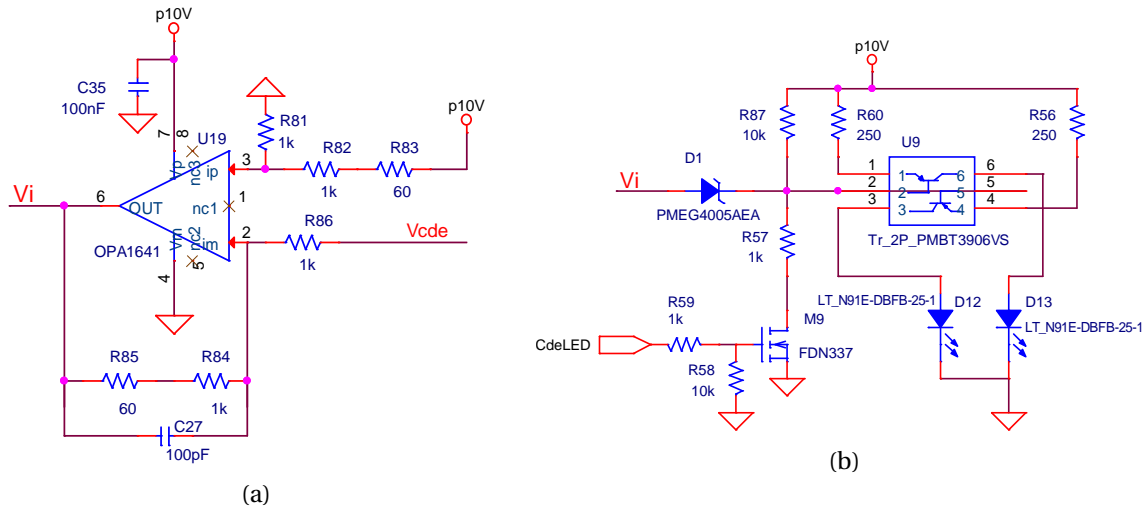


FIGURE 3.22 – Module de LED, référence de courant (a), circuit de commande des LEDs (b).

La partie détection se compose d'une photodiode par réservoir (Figure 3.23). Elles intègrent chacune une pré-amplification dont le gain, et par conséquent la bande passante, peut être modifiée en fonction des résistances montées dans la boucle d'amplification. La bande passante est de 4 kHz pour un gain de 1000.

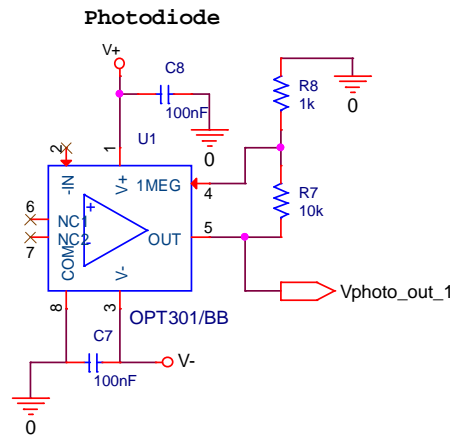


FIGURE 3.23 – Schéma électrique du circuit de détection du signal optique provenant d'une photodiode.

Tous les éléments cités ci-dessus ont été assemblés pour constituer le prototype piloté par un module de commande. Nous avons sélectionné un module d'acquisition de signaux (DAQ) de National Instrument commandé par USB.

Le choix s'est porté sur le Ni-USB 6212, qui comporte 32 entrées/sorties digitales, 16 entrées analo-

Chapitre 3. Procédés technologiques et fabrication

riques 16 bits et 2 sorties analogiques 16 bits et opérant à une fréquence maximale de mesure de 250 kHz. Les sorties analogiques sont utilisées pour commander la valeur du courant dans les LEDs, les entrées analogiques mesurent la tension en sortie des photodiodes et les sorties digitales commandent l'allumage des LEDs.

Un logiciel de commande a été développé en langage C sous Labwindows CVI pour piloter le module. Il permet d'effectuer les commandes de base et de lancer des acquisitions automatiques sur de grandes durées. Le logiciel permet de définir le nombre de réservoirs utilisés et donc le nombre de LEDs à activer. Le courant traversant les LEDs peut être défini à une valeur comprise entre 0 et 25 mA. Ce logiciel permet, également, de définir les paramètres de travail, tels que la durée d'acquisition, la périodicité des mesures et la durée totale des mesures.

Chaque mesure effectuée est une moyenne de 100 acquisitions étalées sur la durée d'acquisition. Typiquement, pour une période de 100 ms, la fréquence d'échantillonnage est de 1 kHz mais qui peut être ajustée en fonction de la durée d'acquisition voulue.

Lors des premiers essais, nous avons remarqué que le système nécessite un temps de stabilisation du signal mesuré par la photodiode à partir du moment où les LEDs illuminent le réservoir. En fonction des premiers résultats, nous avons estimé qu'il fallait environ 100 ms, que nous avons alors intégré au logiciel. Par ailleurs, le logiciel permet le suivi des mesures au cours du temps pour chaque réservoir, ainsi que les 100 acquisitions de la dernière mesure effectuée, via une interface graphique dont un exemple est montré en figure 3.24.

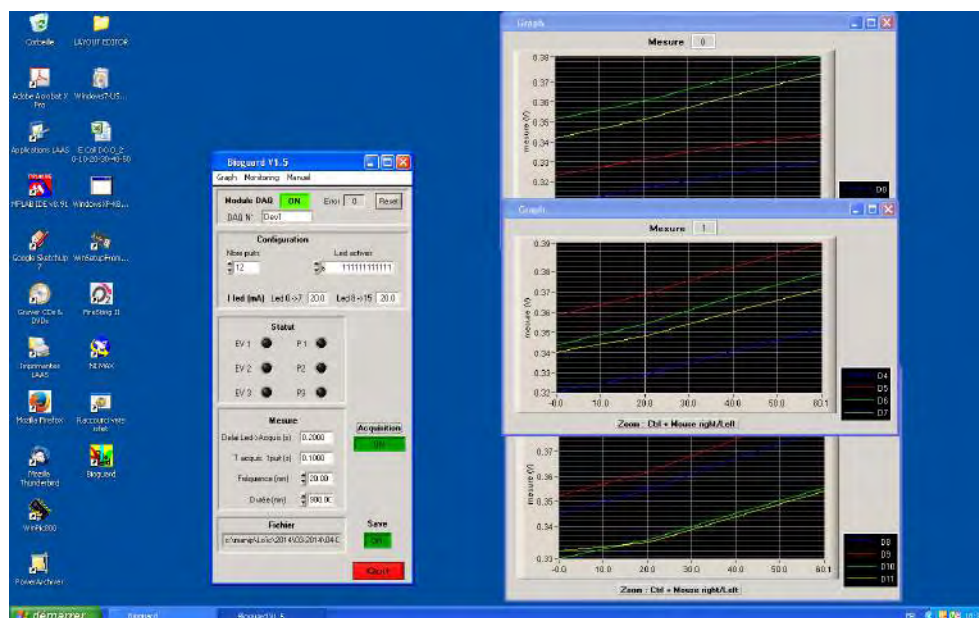


FIGURE 3.24 – Capture d'écran du logiciel de commande et d'acquisition développé en LabWindows CVI.

3.4 Les technologies de la biologie : de la culture à l'expérimentation

3.4.1 Les milieux biologiques

En rappelant que l'objectif de notre travail de thèse réside en la mesure de la DBO à travers le suivi de la consommation d'oxygène par des bactéries, nous allons présenter les deux milieux biologiques que nous avons utilisés pour d'une part maîtriser leur culture et d'autre part pour effectuer nos expériences.

3.4.1.1 Le milieu de culture LB

Les bactéries ont besoin de certains nutriments pour se développer et se multiplier. L'un des milieux le plus couramment utilisé est le milieu LB. Il s'agit d'un milieu de culture nutritif dont la formule a été publiée dans un article en 1951 [Bertani, 1951] servant à la culture bactérienne, et est devenu un standard dans l'industrie pour la culture des *Escherichia Coli*. Le milieu LB est couramment appelé milieu Luria-Bertani, du nom des deux biologistes l'ayant mis au point. Cette dénomination a été réfutée en 2004 par Bertani lui-même dans son dernier article [Bertani, 2004]. Il indique qu'initialement, l'acronyme LB signifie Lysogeny Broth, c'est-à-dire bouillon de culture pour l'étude de la lysogénie.

Ce milieu est composé de Tryptone, d'extrait de levure et de sel NaCl. Différentes formulations ont vu le jour depuis la création de ce milieu. Pour notre part, nous avons utilisé la formulation Luria dont la composition, pour 1L d'eau déminéralisée, est : 10g de tryptone, 10g d'extrait de levure, 5g de NaCl. Le LB peut également se faire en gélose, pour la culture sur boîte de Pétri, auquel cas, à la formule ci-dessus, 15gr d'Agar-Agar est ajouté. Les LB liquide et en gélose ont été achetés sous forme de poudre chez Fisher Scientific (ref. 12156620 pour la formulation liquide, ref. 4914C pour la formulation gélosée).

3.4.1.2 Le milieu minimum M9

L'établissement d'un modèle précis nécessite un contrôle quasi parfait de tous les paramètres de l'expérience, ceci passe également par une connaissance parfaite du milieu utilisé pour l'expérience. Le contrôle total du milieu impose généralement des milieux pauvres (milieu minimum), dont le plus fréquent est le M9. Ce milieu comporte les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance bactérienne. Il se compose de différents sels ; sulfate de magnésium heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), chlorure de calcium (CaCl_2), phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4), dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), chlorure d'ammonium (NH_4Cl), chlorure de sodium (NaCl) et d'une source de carbone (glucose). Le glucose n'a pas été rajouté à la solution M9 finale, afin de pouvoir modifier facilement la concentration en glucose de l'échantillon de test.

3.4.2 Estimation de la population bactérienne

Il existe de nombreuses méthodes permettant d'estimer une population de bactéries, soit en milieu solide, soit en milieu liquide. La plus simple, et certainement la plus utilisée, est l'estimation de la population via la mesure de la densité optique (DO). Cette méthode utilise la Loi de Beer-Lambert. Elle lie l'absorption de la lumière traversant le milieu avec la concentration en bactéries.

Plus la concentration en bactéries est importante plus le milieu est trouble et donc plus la lumière est absorbée. L'absorbance, pour une longueur d'onde du faisceau incident, sera donc liée à la concentration C en bactéries par :

$$A_{\lambda} = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon_{\lambda} l C \quad (3.1)$$

Avec A l'absorbance (ou densité optique) à la longueur d'onde λ , I_0 l'intensité de la lumière incidente, I l'intensité de la lumière sortante, ϵ le coefficient d'extinction molaire, l la longueur du trajet optique et C la concentration molaire de la solution.

Bien que cette technique soit empirique, elle permet d'avoir une bonne estimation de la population en ayant préalablement établi une courbe d'étalonnage donnant la concentration en bactéries en fonction de la densité optique. Pour cela, nous avons utilisé une technique de dénombrement sur milieu gélosé. Nous avons réalisé une culture d'*E. Coli*, nous avons ensuite réalisé un gradient de dilution logarithmique afin d'avoir plusieurs échantillons à des concentrations différentes. Autant de boîtes de Pétri que d'échantillons ont été ensemencées puis mis en incubation pendant 24h. En partant du principe que chaque colonie ne provient que d'un seul germe, la formule suivante permet de connaître la concentration bactérienne pour une DO donnée.

$$N = \frac{n}{d} \quad (3.2)$$

Avec N la concentration bactérienne en nombre de bactérie/ml, n le nombre de colonies dénombrées et d le facteur de dilution.

Pour une DO de 0,23 nous obtenons une concentration d'environ $9,2 \cdot 10^7$ bactéries/ml.

3.4.3 Protocole de préparation des bactéries

Le protocole de préparation des bactéries, que nous allons utiliser pour nos expériences, débute par une étape de conservation jusqu'à la préparation des échantillons à analyser.

La solution finale doit contenir 80% de suspension bactérienne, 10% de sources de carbone sous forme de glucose et 10% de résazurine. Les sources de carbone sont préparées séparément à partir

d'une solution mère de glucose filtrée à $0,22 \mu\text{m}$ et diluées avec de l'eau DI stérile. En sachant que la concentration en glucose finale est de 10% de la solution totale, nous devons préparer une source de carbone 10 fois concentrée par rapport à la concentration finale souhaitée. L'équipe de biologistes du CBAC a défini une concentration bactérienne idéale dans l'échantillon de 1.10^8 bactérie/ml. Elle correspond à une DO de 0,22 avec notre spectromètre.

Toutes nos expériences ont été menées avec une souche *E. Coli* que nous avons récupérée sous forme congelée, et constitue notre réserve. Nous avons dans un premier temps réalisé une pré-culture. Les bactéries congelées ont été mises en suspension dans un tube à essai contenant du milieu LB liquide et placées dans un incubateur agitant à 30°C durant une nuit. Au matin, la DO de la pré-culture est mesurée, et une culture est lancée à partir d'une DO de 0,05, la culture est placée sous incubation et agitation à 30°C pendant 2h. En parallèle, nous avons préparé une solution bactérienne, à partir de la pré-culture, à une DO de 0,1 dans du LB afin d'ensemencer une boîte de Pétri contenant du LB-gélose, pour constituer un stock pour une utilisation régulière. La culture est ensuite amenée à une DO de 0,27, car la DO finale de 0,22 doit tenir dans 80 % du volume final. Elle est ensuite centrifugée¹ afin de séparer les bactéries du milieu de culture, puis lavée avec une solution de sulfate de magnésium (MgSO_4) à 10^{-2} mol/l. Les étapes de centrifugation et lavage sont répétées trois fois afin d'enlever toute trace de carbone organique contenu dans le milieu de culture. Une dernière étape de centrifugation est alors réalisée afin de remplacer la solution de lavage par le milieu M9. La densité optique est à nouveau mesurée et ajustée à 0,27. Les bactéries sont réservées dans la glace afin de stopper leur croissance.

Enfin, la résazurine et la solution de source de carbone sont mélangées avec la solution bactérienne afin de réaliser la solution finale. La densité optique de cette préparation est alors d'environ 0,22.

3.5 Conclusion

Nous avons résumé, dans ce chapitre, les procédés de fabrication des dispositifs « macro » et « micro » et les techniques d'intégration des capteurs optique.

Dans un objectif, in fine, de mesure sur site, nous avons réalisé le dispositif « macro » en version automatisée et nous l'avons intégré dans une mallette thermostatée. Nous retiendrons, de l'automate, que le choix des éléments électro-fluidiques dépend grandement de l'architecture fluide du système et de la vitesse de remplissage désirée. Nous avons choisi, pour ce prototype, une micro-pompe à solénoïde, qui offre une grande précision des volumes injectés, mais cela, au détriment du débit.

Nous avons réalisé deux dispositifs « micro », en technologie verre-PDMS. Le premier a été réalisé pour y intégrer une optode, mais il comportait un défaut de remplissage. Ainsi, un second dispositif a été fabriqué afin de résoudre ce défaut et pour l'utilisation d'un second capteur : la résazurine. Les réservoirs et les canalisations ont été structurés dans le PDMS grâce à un moule en SU8. Une lame de

1. Conditions de centrifugation : vitesse 5000 tr/min, temps 5 min, température 4°C

Chapitre 3. Procédés technologiques et fabrication

verre de microscope a permis de fermer les puces. A travers ce chapitre, nous avons vu la difficulté d'intégration des optodes dans les biopuces. En effet, contrairement à la résazurine, qui est liquide et s'intègre facilement dans l'échantillon, l'optode a nécessité d'être placée sur un capot en verre enduit de SU8. Les techniques classiques de collage, plasmaO₂, n'ont pas pu être utilisées pour les biopuces avec optode, au risque de les détruire.

Nous avons décrit, également, la réalisation du lecteur de fluorescence de la résorufine. Nous avons choisi les composants optiques (LEDs, photodiodes et filtres) en fonction des caractéristiques de la résorufine et du coût des composants. Nous avons pu réaliser un lecteur, qui répond à nos exigences, avec des composants traditionnels. Chaque composant a été caractérisé, à l'aide d'un banc de mesure optique, afin de connaître précisément leurs caractéristiques. Notons, d'une manière générale, que les caractéristiques fournies par le fabricant sont parfois éloignées de la réalité. Un logiciel permettant de commander le lecteur a été développé en LabWindows CVI.

Finalement, nous avons décrit les milieux de culture utilisés pour nos expérimentations : le milieu LB pour la culture et le milieu M9 pour les tests. Nous avons présenté, également, le protocole de préparation des bactéries et des échantillons de tests.

4 Résultats expérimentaux et interprétations

Ce chapitre présente les résultats expérimentaux visant à valider le principe d'une mesure de DBO par le suivi de la consommation d'oxygène d'une population bactérienne, en fonction de la concentration en produits carbonés.

Nous présenterons, tout d'abord, les courbes de consommation d'oxygène par les bactéries, mesurées grâce aux optodes. Nous verrons, ensuite, les expériences basées sur la dégradation de la résazurine, induisant une fluorescence fonction de l'activité bactérienne. Nous étudierons certains facteurs d'influence tels que, la température d'incubation, la concentration en carbone organique présente dans l'échantillon ou encore la concentration initiale en biomasse. Nous évaluerons les performances potentielles d'un tel principe. Nous commenterons les résultats obtenus et proposerons un modèle théorique qui témoignera de la conformité du comportement bactérien mesuré avec les mécanismes biologiques connus de la croissance bactérienne. Nous l'utiliserons pour en extraire, au plus tôt de la dynamique de croissance, des indicateurs représentatifs de la DBO, ou de la charge carbonée.

4.1 Principaux résultats expérimentaux

Nous allons résumer, dans cette première partie, les résultats des expériences réalisées sur nos systèmes « macro » et « micro », intégrant soit une optode, soit la résazurine. Nous verrons, au travers de certains facteurs d'influence, les zones de validité de mesure et les limitations des systèmes.

4.1.1 Mesure de la consommation bactérienne en oxygène sur le macrosystème à optodes

Nous utilisons dans ces premières expériences le dispositif « macro », présenté dans le chapitre 3. Une optode placée dans la culture mesure la consommation de l'oxygène dissous en présence de bactéries et de carbone organique. L'oxygène dissous est un indicateur direct de la biodégradation du

carbone organique par les bactéries. Ces expériences ont été réalisées avec du milieu Luria-Bertani (LB), habituellement utilisé comme bouillon de culture. Les bactéries s'y développent facilement car tous les éléments nécessaires à la croissance bactérienne y sont présents.

Dans cette étape « macro », l'objectif est de valider le concept de mesure, de définir un « point de mesure référent » comparable aux tests normalisés de DBO en macro-volume. Cela afin de pouvoir les comparer, ensuite, avec les résultats obtenus en micro-volume sur biopuces.

4.1.1.1 Effet de la concentration en carbone organique sur la consommation des bactéries

Nous avons commencé par observer l'effet de la concentration en carbone organique sur la cinétique de consommation des bactéries. Pour cela nous avons préparé plusieurs échantillons en diluant du milieu LB avec une solution d'eau DI et de NaCl à 5 g/l (concentration en NaCl dans le milieu LB), afin de ne pas changer la pression osmotique du milieu.

La figure 4.1 présente les courbes du suivi de l'oxygène dissous au cours du temps et selon différentes concentrations en carbone organique. Nous avons préparé un échantillon de milieu LB, quatre dilutions (par 10, 100, 300 et 500), et un témoin (Eau DI dont NaCl à 5 g/l). Les échantillons ont étéensemencés avec un inoculum d'E Coli d'environ $1,2 \cdot 10^8$ cell/ml. Ils ont été placés dans la mallette, que nous avons fabriquée, permettant d'isoler les échantillons de la lumière et de les réguler à une température de 30°C.

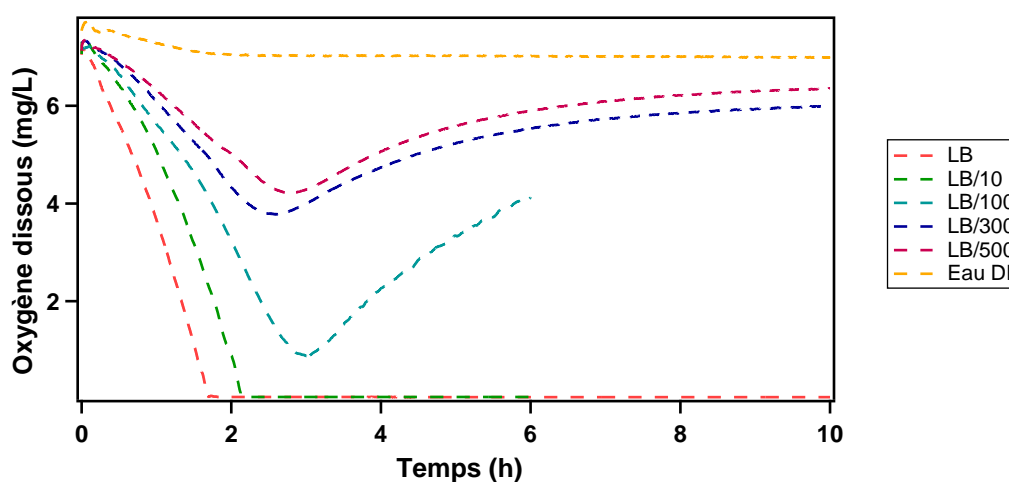


FIGURE 4.1 – Expériences de consommation de l'oxygène par E. Coli ($1,2 \cdot 10^8$ cell/ml) exposées à 5 concentrations de milieu LB (LB, dilutions par 10, 100, 300 et 500) et 1 témoin (eau DI + NaCl à 5 g/L).

Nous observons une effective diminution de la concentration en oxygène dissous dont la dynamique croît avec la concentration en carbone organique. Nous remarquons que certains des niveaux minimaux atteints sont non-nuls. Cela indique une dégradation totale de la matière organique. Notons toutefois que les valeurs de ces niveaux sont fonction de la concentration initiale en carbone : plus

il y a de carbone organique plus la quantité d'oxygène nécessaire à sa dégradation est importante. La quantité d'oxygène dissous étant limitée, si la culture s'opère dans un module hermétique, nous observons une limitation de la gamme de carbone mesurable. En effet, pour les échantillons fortement concentrés en carbone organique, l'oxygène dissous est consommé avant que la totalité du carbone n'ait été dégradée. C'est donc dans le cas des faibles concentrations que la mesure de la DBO peut être faite dans les meilleures conditions, puisque l'on a les valeurs initiales et finales de l'oxygène dissous. Ce qui permet de remonter à la concentration en matières carbonées. En première analyse, ce type de mesure va donc nécessiter un ajustement des concentrations (dilution du prélèvement), pour rentrer dans la zone de validité de la mesure et dans un délai d'obtention du résultat de quelques heures.

Les courbes présentent une différence de cinétique selon l'échantillon. Il semble que le taux de consommation de l'oxygène dissous soit fonction de la concentration initiale en carbone organique S_0 . Cette hypothèse est validée par les travaux de Liu [Liu, 2000] sur l'influence du rapport S_0/X_0 sur le rendement de croissance bactérienne. Il indique que ce dernier est d'autant plus fort que le rapport S_0/X_0 est faible.

Nous notons aussi une légère diminution de l'oxygène dissous dans le témoin. Cela dénote d'une activité bactérienne malgré l'absence de carbone organique. Les biologistes attribuent ce phénomène au fait que les bactéries cumulent des réserves de nutriments et puisent dans ces réserves lorsque le carbone organique est manquant.

Finalement, une dernière observation peut être faite, une augmentation de l'oxygène apparaît sur trois des cinq concentrations de LB (LB/100, LB/300 et LB/500) au bout d'environ 3 heures de mesure. Ceci s'explique par la diffusion de l'oxygène de l'air extérieur vers l'intérieur de la chambre de mesure, et également des bulles d'air piégées dans la chambre. La diffusion existe depuis le début de l'expérience mais la vitesse de diffusion est plus faible que la vitesse de consommation de l'oxygène, on ne la voit donc pas avant 3 heures. Lorsque le milieu commence à être purifié de toute trace de carbone organique, l'activité bactérienne ralentie, la diffusion prend alors le dessus sur la consommation de l'oxygène. Cette diffusion peut poser des problèmes sur l'exploitation des résultats pour la mesure précise de la DBO.

4.1.1.2 Effet de la densité de population sur la vitesse de dégradation

Pour tester l'effet de la densité de population de l'inoculum sur la cinétique de consommation de l'oxygène, nous avons mené trois expériences dans les mêmes conditions de milieu de test et de température, à savoir en milieu LB et à 30°C. Les densités testées sont $1,12 \cdot 10^5$, $1,12 \cdot 10^6$ et $1,2 \cdot 10^7$ cell/ml. La figure 4.2 montre les résultats de ces expériences.

Les résultats obtenus montrent clairement que la vitesse de consommation de l'oxygène dissous, et donc de dégradation des matières organiques, est fonction de la densité de population de l'inocu-

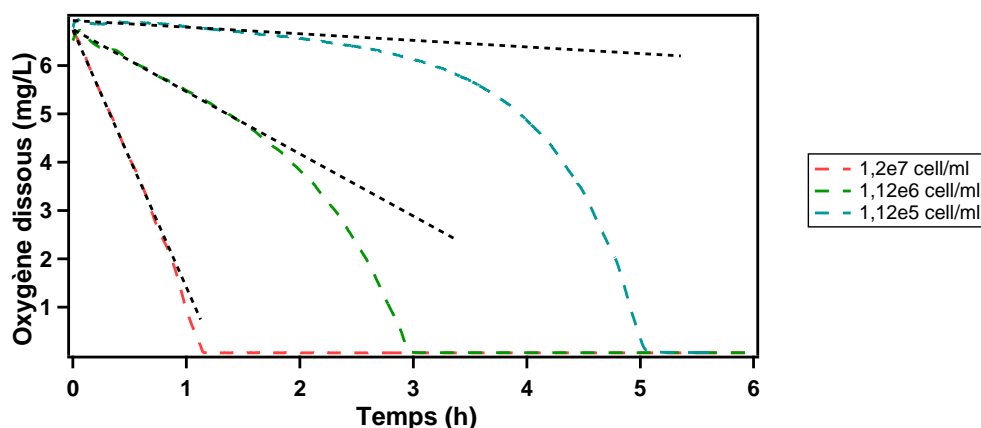


FIGURE 4.2 – Effet de la densité de population de l'inoculum sur la cinétique de consommation d'oxygène.

lum. En effet, l'oxygène sera plus rapidement consommé si la population initiale est importante, et inversement si la population est faible, elle mettra plus de temps à consommer la même quantité d'oxygène. Sur la figure 4.2, dans le cas de la plus forte densité, la cinétique de consommation de l'oxygène est quasiment une droite. Plus la densité initiale en bactéries est faible, plus la courbe tend vers une parabole.

Le tracé des pentes à l'origine permet de suivre l'évolution de la consommation d'oxygène par les bactéries. On constate, ainsi, qu'on passe de 5,34 mg/l/h pour la plus forte densité bactérienne à 0,14 mg/l/h pour la plus faible densité et 1,29 mg/l/h pour la densité intermédiaire. L'épuisement d'oxygène présent dans l'échantillon est presque total au bout d'une heure pour la densité $1,2 \cdot 10^7$ cell/ml, alors que pour la densité la plus faible, $1,12 \cdot 10^5$ cell/ml, sa consommation reste négligeable pendant une durée proche de 3 h.

La durée de la mesure est donc liée à la densité de population de l'inoculum. Pratiquement, il paraîtrait alors logique de positionner le point de mesure à une forte densité afin de réduire le temps de mesure et de travailler sur la pente pour avoir très vite des indications sur la DBO. Le risque, identifié par les biologistes, est que l'inoculum injecté puisse contenir des bactéries mortes qui représentent alors une source de carbone parasite pour les bactéries vivantes et donc être une source de variabilité des résultats. De ce fait, plus l'inoculum est dense plus la variabilité des sources de carbone est importante, ce qui expliquerait la forte variabilité du test standardisé de DBO (autour de 20%).

4.1.1.3 Analyse des performances et limites du système

4.1.1.3.a Reproductibilité des mesures

Afin d'avoir un système de mesure efficace, nous devons nous assurer de la reproductibilité des mesures. Pour cela, nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales qui ont bien fonctionné, et nous avons répété les mesures. Nous avons choisi les conditions expérimentales suivantes : échantillons de milieu LB dilué par 10, température de 30 °C et un inoculum de 4.10^6 cell/ml.

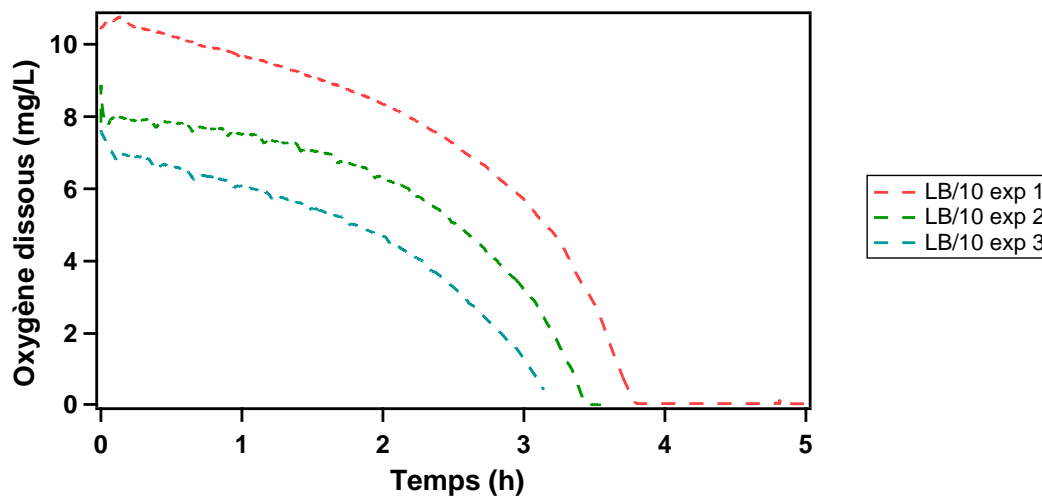


FIGURE 4.3 – Graphique résumant la reproductibilité des mesures.

Nous pouvons voir sur la figure 4.3, que les courbes sont bien différentes. Cela dit, nous observons que les cinétiques sont très semblables, mais les niveaux d'oxygène dissous sont différents.

Cette différence peut s'expliquer par un défaut de calibrage de l'oxymètre. Il s'effectue en 2 points : 0% et 100% de la saturation en oxygène dissous dans l'eau DI à température et salinité connues. La saturation en oxygène dissous est très dépendante de ces deux derniers paramètres. Si la désoxygénation pour le point 0% et l'oxygénation pour le point 100% ne sont pas réalisés scrupuleusement identiquement d'une expérience à l'autre, la concentration initiale en oxygène dissous peut différer.

Il y a là une difficulté de mise en œuvre de la mesure : le protocole de calibration est impératif, et délicat, car il suppose de maîtriser parfaitement les conditions environnementales. Il sera plus utile dans les applications futures de revenir sur ce point, afin de trouver un système de calibrage mieux adapté.

4.1.1.3.b Diffusion parasite de l'oxygène

Rappelons que selon notre interprétation, l'oxygène qui diffuse de l'air extérieur vers la chambre de mesure perturbe le processus de mesure. C'est un trou réalisé sur le capot du système macro, afin de laisser l'air de la chambre s'échapper lors du remplissage, qui peut principalement être mis en cause. Dans le but d'éliminer cette diffusion, nous avons utilisé de l'huile paraffine comme bouchon à la diffusion de l'oxygène. L'huile est un liquide non miscible dans l'eau et moins dense, ce qui lui permet de rester au-dessus de l'eau. L'expérience réalisée visant à déterminer l'efficacité de l'huile comme frein à la diffusion consiste à utiliser une chambre de mesure de manière habituelle, c'est-à-dire avec seulement l'échantillon à analyser, et dans une seconde chambre, un échantillon issu de la même préparation auquel on ajoute un volume d'huile paraffine. L'échantillon préparé est composé de milieu LB dilué par 200ensemencés par un inoculum d'environ $1,2 \cdot 10^7$ cell/ml.

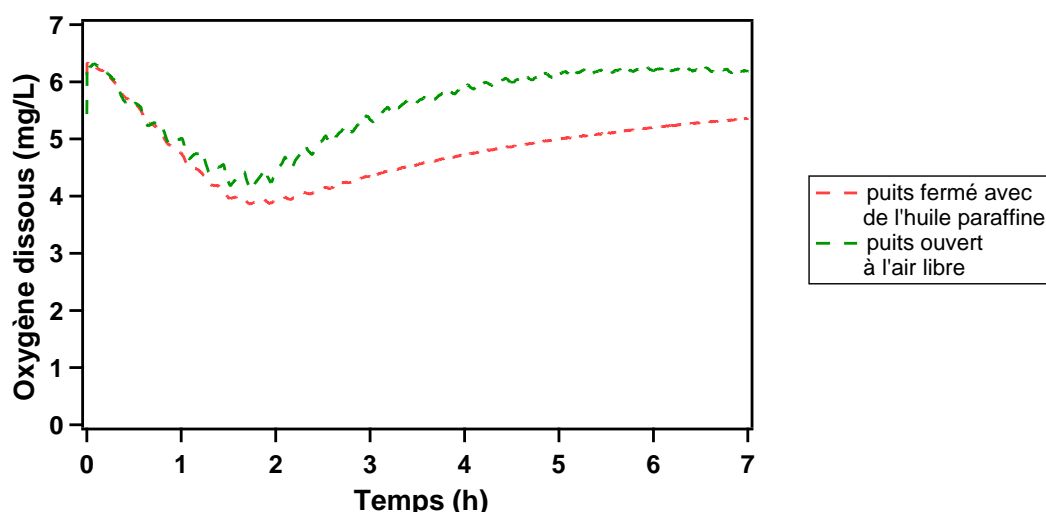


FIGURE 4.4 – Résultat du test de réduction de la diffusion de l'oxygène avec une couche d'huile paraffine.

Les résultats présentés sur la figure 4.4 indiquent bien que la diffusion de l'oxygène dans la chambre avec l'huile paraffine ralentit la diffusion comparée à la chambre sans huile. Cependant, elle n'est que ralentie, cette méthode n'est donc pas suffisamment concluante.

Notons également, que certaines bactéries sont capables de dégrader les huiles. Il est possible que des souches bactériennes du panel utilisé dans le futur système rentrent dans cette catégorie de bactéries. L'huile paraffine serait donc une source de carbone parasite. L'ajout d'huile paraffine complexifie également le système. En effet, cela rajoute un fluide à gérer dans le système fluide car il doit être ajouté à chaque chambre pour chaque mesure. Un dernier point, l'huile étant un corps gras, des traces peuvent rester sur les parois d'une mesure à l'autre. Ces traces peuvent contaminer la mesure suivante si elles emprisonnent des bactéries ou des matières organiques dégradables.

Nous voulions, par la conception d'une mallette de mesure utilisant des chambres de culture « macro », définir un point de mesure servant de mesure référente et préfigurer un système opérationnel terminal complet intégrant une gestion automatique des fluides. Les résultats de ce paragraphe montrent la faisabilité du principe mais mettent en évidence des difficultés de reproductibilité.

4.1.2 Mesure de la consommation bactérienne sur biopuce avec optode

Nous avons voulu ici, non pas obtenir une empreinte précise de la part biodégradable de l'échantillon selon le type de carbone organique, mais démontrer la possibilité de mesurer en micro-volume. La technologie de fabrication des puces a été détaillée dans les chapitres 2 et 3. L'épaisseur des puces, c'est-à-dire la profondeur des puits, est de seulement 500 μm . Notons qu'il s'agit de l'épaisseur finalement choisie, après de nombreuses expériences, permettant d'obtenir une variation significative de la consommation d'oxygène. L'épaisseur des premières puces était de 200 μm , d'où sont issus les résultats présentés ci-après.

4.1.2.1 Premiers résultats

Nous avons réalisé les mesures sur deux solutions différentes : la première contenant du milieu LB et une population bactérienne d'environ 8.10^7 cell/ml et la seconde le même milieu mais une population de 4.10^7 cell/ml. Dans ces conditions, les systèmes macroscopiques atteignent une concentration en oxygène nulle (Figure 4.1). Tandis que sur nos puces, nous observons que la concentration en oxygène descend jusqu'à 5 mg/l d'oxygène puis nous observons une remontée de la concentration (Figure 4.5). En se référant à nos interprétations précédentes, nous pouvons déduire que ce phénomène pourrait s'expliquer par la porosité du PDMS : les molécules d'oxygène diffuseraient à travers les cloisons des réservoirs et alimenteraient alors la solution en test. Ce phénomène est d'autant plus important que le rapport surface/volume est grand. C'est-à-dire que plus la miniaturisation est poussée, plus le phénomène est considérable. Cet apport parasite continu d'oxygène devrait alors être pris en compte et son influence étudiée pour faire la part de la consommation réelle des bactéries.

4.1.2.2 Porosité du PDMS

Nous avons alors réalisé une expérience afin de vérifier que l'augmentation de l'oxygène est bien due à la porosité du PDMS et non à cause d'un autre phénomène. L'expérience est très simple, nous avons d'abord injecté de l'éthanol (1) afin de mouiller les parois pour faciliter le remplissage avec l'eau et pour chasser les bulles d'air. Nous injectons ensuite de l'eau DI (2) puis de l'eau DI préalablement désoxygénée (3), enfin nous arrêtons le remplissage et nous observons la remontée de l'oxygène (4).

La porosité du PDMS est clairement mise en évidence et apporte des difficultés de mesure. En effet, d'après la loi de Fick sur la diffusion des gaz, le débit de transfert est d'autant plus important que la

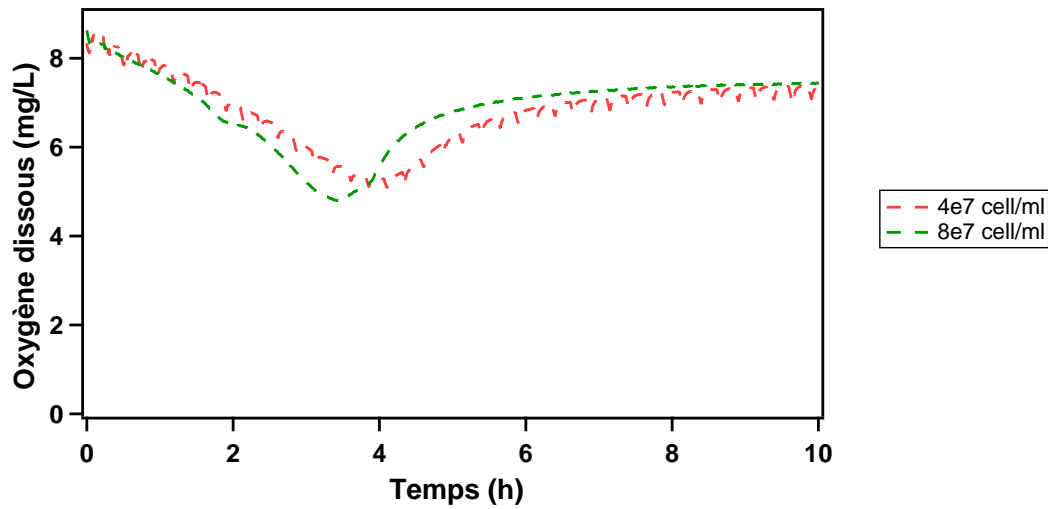


FIGURE 4.5 – Évolution de la concentration en oxygène dissous dans une biopuce pour deux populations bactériennes.

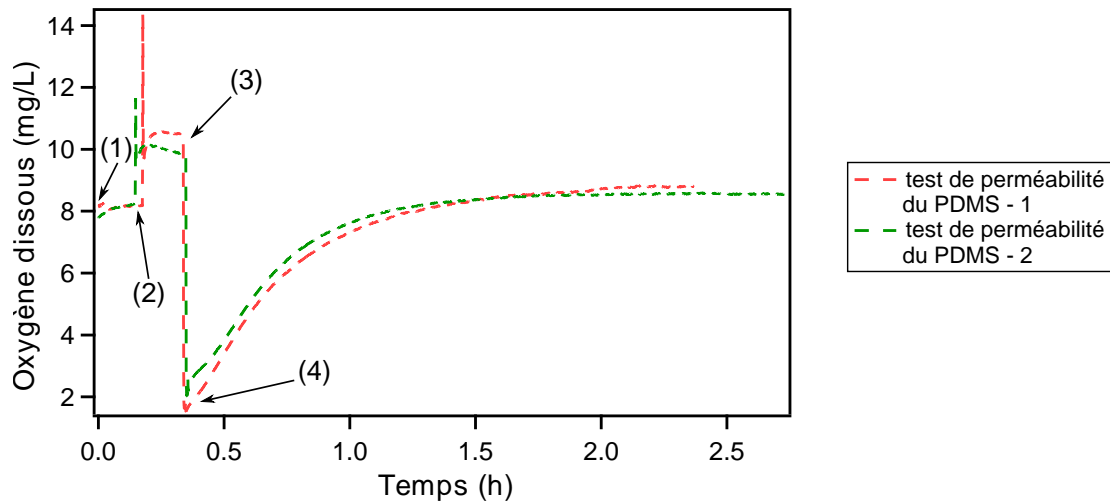


FIGURE 4.6 – Courbes de mesure d'oxygène dans des puits en PDMS réalisées pour des tests de porosité : (1) injection d'éthanol, (2) injection d'eau DI oxygénée, (3) injection d'eau DI désoxygénée et (4) arrêt de l'injection.

surface de contact fluide/membrane est grande. Dans notre cas, la plus grande surface en contact avec le fluide est de $38,5 \text{ mm}^2$ sur une épaisseur de réservoir de $200 \mu\text{m}$. En connaissant le coefficient de l'oxygène dans l'eau (environ $2.10^{-3} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 20°C), nous en déduisons la vitesse de transfert dans le microvolume : $2,58.10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{s}^{-1}$. Contrairement au macrovolume, où la surface d'échange en contact avec l'air est d'environ 3.14 mm^2 pour une hauteur de réservoirs de 25 mm , la vitesse de transfert est donc de $1,68.10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{s}^{-1}$. Le rapport surface/hauteur de solution est bien plus important en microvolume qu'en macrovolume, la vitesse de transfert est donc plus rapide dans la puce.

4.1.2.3 Réduction de la diffusion de l'oxygène dans la biopuce

Afin de remédier au problème de diffusion de l'oxygène du PDMS dans l'échantillon, nous avons tout d'abord tenté de retirer l'oxygène du PDMS. Pour cela, nous avons placé nos puces plusieurs heures à dégazer sous vide. Nous avons, ensuite, injecté une solution contenant du milieu LB et des bactéries. Nous avons observé que dès l'injection de la solution, la concentration d'oxygène dissous diminuait très rapidement. Nous pouvons en déduire que nous assistons à un phénomène de diffusion de l'oxygène du milieu vers le PDMS.

Nous avons imaginé une seconde méthode pour limiter la diffusion de l'oxygène du PDMS vers la chambre de mesure en enduisant l'intérieur de celle-ci avec une couche de matériau imperméable. La résine SU8 une fois réticulée est imperméable aux gaz. De plus, c'est un matériau biocompatible, il est donc parfaitement adapté à notre besoin. Nous avons à notre disposition, en salle blanche, un spray-coater permettant de déposer par spray une couche mince et uniforme de SU8.

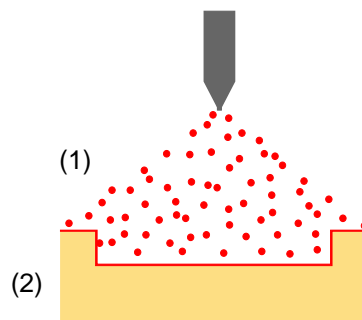


FIGURE 4.7 – Spray-coating SU8 (1) de la puce PDMS (2).

Nous avons réalisé deux expériences avec des puces spray-coatées avec de la SU8, l'une avec du milieu LB et l'autre avec du milieu LB dilué par 200. Les deux échantillons ont étéensemencés avec un inoculum d'environ $1,2 \cdot 10^7$ cell/ml d'une souche d'E. Coli. La température d'incubation était de 30°C.

La figure 4.8 présente les résultats de ces deux expériences. Nous observons que l'oxygène présent dans l'échantillon contenant le LB pur est totalement consommé par les bactéries, ce qui s'accorde avec les résultats obtenus en système macrofluidique (Figure 4.1). Aucune augmentation d'oxygène n'apparaît jusqu'à 10h de mesure. Cependant, cela ne signifie pas qu'il n'y a pas de diffusion. Elle est peut-être présente mais l'oxygène est immédiatement consommé pour dégrader le carbone organique restant. Nous avons donc réalisé une seconde expérience avec un échantillon moins concentré en carbone organique (LB/200). Nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus, dans les mêmes conditions expérimentales, avec une puce non spray-coatée. La puce spray-coatée montre effectivement une diffusion plus lente, mais néanmoins présente, alors que la puce non spray-coatée ne montre pas de diminution significative de la concentration en oxygène dissous.

La diffusion de l'oxygène malgré la couche de SU8 peut s'expliquer par un défaut d'uniformité de la

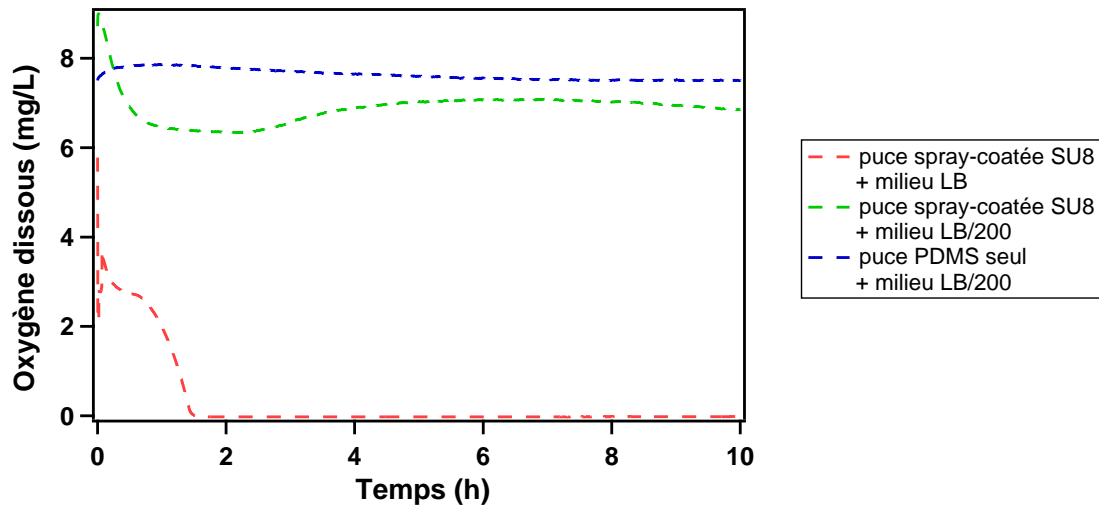


FIGURE 4.8 – Graphique présentant la consommation de l'oxygène dans des puces spray-coatées avec de la SU8.

couche. En effet sur les surfaces planes, la déposition de la SU8 est uniforme, mais au niveau des parois verticales et des angles, la SU8 n'est pas uniformément répartie (Figure 4.9).

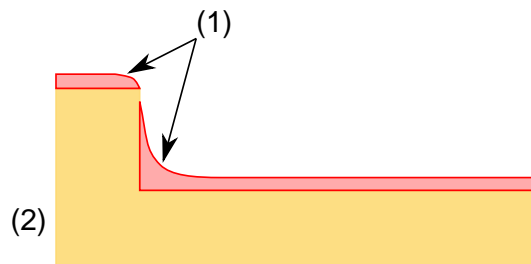


FIGURE 4.9 – Schéma représentant la répartition du dépôt de la couche de SU8 (1) sur les parois de la puce en PDMS (2).

Initialement, la déformabilité du PDMS réalise l'étanchéité entre le PDMS et le verre qui scelle la puce. La couche de SU8, une fois réticulée est un matériau dur et moins déformable que le PDMS. Si le dépôt de SU8 n'est pas parfaitement plan ou s'il est rugueux, l'étanchéité à l'interface n'est donc pas parfaite et les gaz peuvent donc diffuser via l'interface SU8-Verre. Néanmoins, cela améliore l'étanchéité de la puce en limitant les surfaces diffusantes.

4.1.3 Corrélation micro/macro système

L'objectif de ces travaux est de pouvoir répondre à l'une des questions posées en début de thèse, à savoir : peut-on mesurer la DBO dans un microsystème ? Les résultats précédents nous ont montrés que la diffusion de l'oxygène est plus importante dans les microdispositifs du fait du rapport d'échange gazeux surface/volume. Nous avons alors réalisé des expériences avec les puces de fortes épaisseurs

(500 μm d'épaisseur) avec les conditions suivantes : un échantillon avec du milieu LB et une population bactérienne de $9,2 \cdot 10^7$ cell/ml. Le résultat de l'expérience a été comparé avec celui obtenu par les macrosystèmes dans les mêmes conditions expérimentales. La comparaison des deux expériences « macro » et « micro », présentées en figure 4.10, indiquent que notre microsystème suit la même dynamique que le système macroscopique, avec néanmoins un temps de latence.

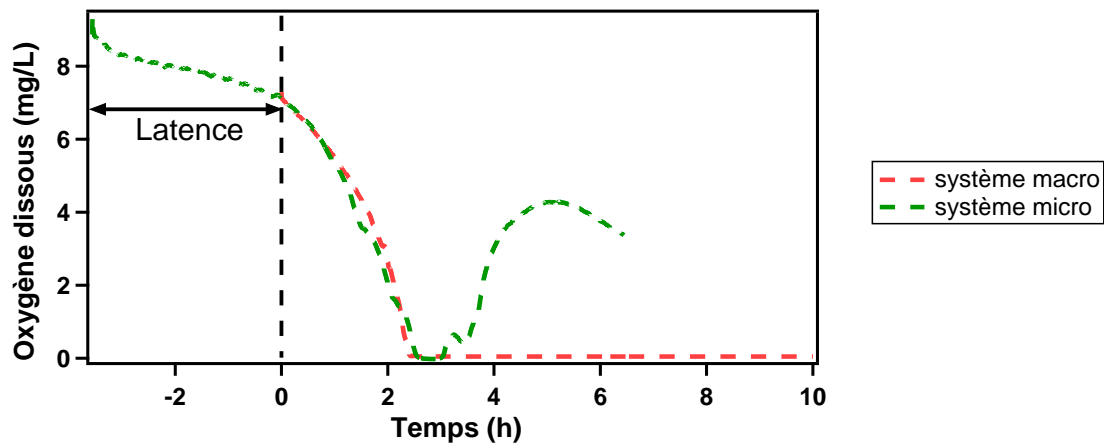


FIGURE 4.10 – Courbes représentant la concentration d'oxygène en fonction du temps pour les systèmes microfluidiques et macroscopique.

Nous pouvons associer ce temps de latence à deux phénomènes possibles. Il peut s'agir d'une phase d'adaptation des bactéries au nouvel environnement. Ou bien, en début d'expérience, la diffusion de l'oxygène dans le puits contrebalance la vitesse de consommation de l'oxygène, lorsque la population bactérienne est suffisamment importante, la consommation prend alors le dessus sur la diffusion.

Bien que le problème de la diffusion de l'oxygène ne soit pas fondamentalement résolu, nous l'avons réduit en enduisant les faces intérieures de la biopuce avec la résine SU8. Elle permet de réduire les surfaces diffusantes en contact avec l'échantillon. Nous pouvons néanmoins répondre à la question que nous nous posons, et pouvons dire simplement oui. Oui, il est possible de mesurer la consommation de l'oxygène, et donc, a fortiori, de la DBO, en microvolume. Afin, de ne plus être contraint par la diffusion de l'oxygène, nous sommes passés sur un autre type de capteur : la résazurine.

4.1.4 Expérimentation avec résazurine

A la suite des difficultés de maîtrise de la diffusion parasite de l'oxygène, nous avons utilisé un autre type de capteur, la résazurine, pour mesurer la DBO d'un échantillon d'eau. Celle-ci a la particularité de remplacer l'oxygène dans le cycle de respiration des bactéries. Cette molécule est réduite en un composé fluorescent, la résorufine, lors du processus de biodégradation de la matière organique. Il est donc aisé de suivre la concentration de la résorufine par la mesure de la fluorescence.

Nous verrons dans cette partie les résultats obtenus à l'aide d'un lecteur de fluorescence que nous avons développé, et les effets de quelques facteurs d'influence. Afin de vérifier l'hypothèse que nous avons évoquée lors des expériences avec les optodes, selon laquelle la variation de cinétique de consommation de l'oxygène en fonction de la dilution n'était pas due à la variation de la concentration en carbone organique, mais plutôt à cause d'autres molécules présentes dans le LB, nous avons utilisé ici du milieu M9 dont nous maîtrisons complètement la composition. Toutes les expériences, présentées ci-après, ont été réalisées dans des puces de nouvelle génération d'une épaisseur de 500 μm .

4.1.4.1 Dégradation du milieu M9 à concentration en glucose contrôlée

La première expérience réalisée visait à observer l'effet de la variation de la concentration en carbone organique, et également à vérifier si elle joue un rôle sur la vitesse de dégradation. Pour cela, nous avons préparé le milieu M9 sans la source de carbone, nous pouvions alors faire varier la concentration de la source de carbone sans faire varier les autres éléments constituant le milieu. Plusieurs échantillons ont été préparés avec différentes concentrations en carbone organique. Les résultats obtenus ont été regroupés en figure 4.11. Nous pouvons constater que pour les cinq échantillons testés, il y a une variation temporelle de la fluorescence mesurée à travers les photodiodes.

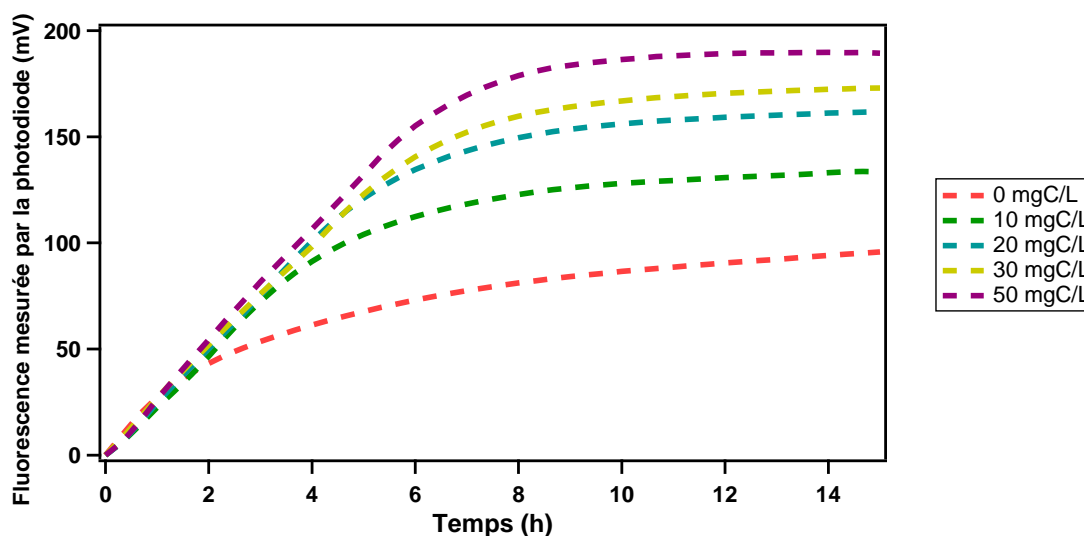


FIGURE 4.11 – Courbes de fluorescence au cours du temps de plusieurs échantillons à différentes concentrations en carbone organique.

Les courbes semblent s'accorder avec la croissance bactérienne. En effet, nous observons une première phase linéaire de l'augmentation de la fluorescence, qui correspond à la phase de croissance exponentielle des bactéries. Nous pouvons maintenant affirmer que la concentration en carbone organique n'intervient que faiblement sur la vitesse de dégradation des bactéries. Il vient ensuite une phase de ralentissement de la fluorescence, qui correspond à la disparition du carbone organique. Et finalement,

une phase de stabilisation du signal avec cependant une légère augmentation continue, qui peut s'expliquer par la dégradation de la lyse bactérienne et par l'épuisement de leur réserve nutritionnelle. Cet effet est d'autant plus marquant qu'il n'y a aucun nutriment pour l'échantillon témoin (courbe à 0 mgC/l). Finalement, nous pouvons constater que l'oxygène et sa diffusion dans la chambre ne perturbent pas la mesure.

4.1.4.2 Effet de la température sur l'activité bactérienne

Pour observer l'effet de la température d'incubation sur la croissance bactérienne, et l'effet induit sur la cinétique de fluorescence de la résorufine, nous avons réalisé deux expériences avec du milieu M9 à différentes concentrations en carbone organique. Une première expérience a été effectuée à température ambiante, soit 23°C, pendant 15 h. Puis, une seconde expérience a été effectuée à 30°C, pendant 15 h également. Dans les deux cas, un inoculum d'*E. Coli* à une concentration d'environ $8,6 \cdot 10^7$ cell/ml a été introduit dans les échantillons. En accord avec les mécanismes déjà connus de la croissance bactérienne, la figure 4.12 montre bien l'effet de la température d'incubation sur la vitesse de dégradation des matières organiques.

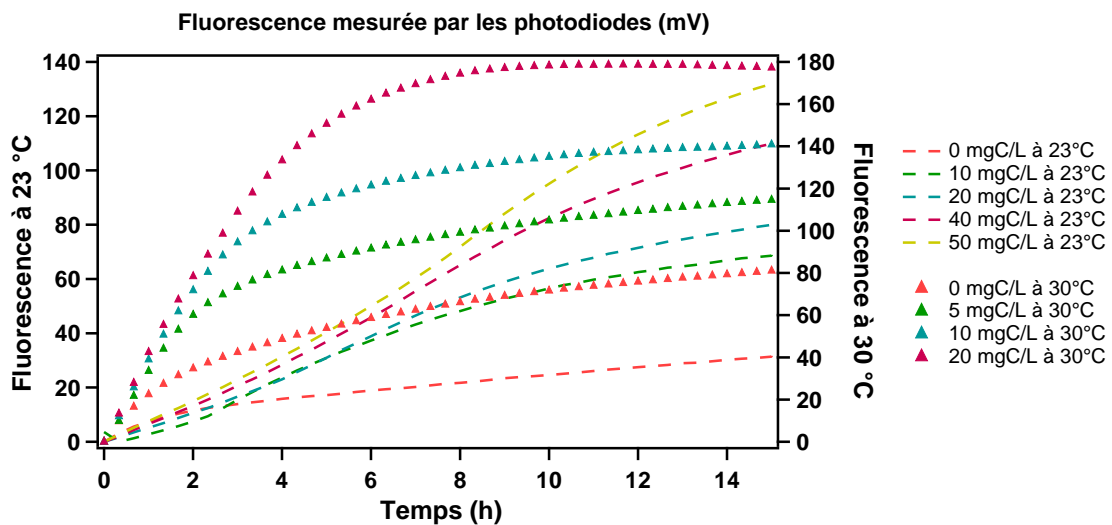


FIGURE 4.12 – Graphique montrant l'effet de la température d'incubation sur la cinétique de fluorescence provenant de puits incubés à $8,6 \cdot 10^7$ cell/ml bactéries.

En effet, le métabolisme des bactéries fonctionne plus ou moins rapidement selon la souche bactérienne. Pour notre expérience, la souche utilisée était *E. Coli*, sa température optimale de croissance est de 37°C. Les résultats obtenus sont donc correct vis-à-vis de la souche utilisée. A 23°C, les bactéries se développent lentement, si bien qu'au bout de 15h de mesure, les courbes ne se stabilisent pas encore, cela signifie que le carbone organique n'est pas encore totalement dégradé. Par contre, à 30°C, les bactéries se développent plus rapidement, et au bout de 9h de mesure, il ne semble plus y avoir

d'évolution significative de la fluorescence, le carbone organique étant alors complètement dégradé.

4.1.4.3 Influence des paramètres optiques sur la mesure

Lors des premières expériences avec la résazurine, le lecteur de fluorescence n'était pas équipé de filtre optique d'excitation, seulement de filtre d'émission de moindre qualité (filtre A). Le spectre de transmission du filtre était largement décalé par rapport au pic d'émission de la résorufine, mais tout en étant dans la gamme spectrale d'émission de la fluorescence, afin que la lumière des LED ne soit pas transmise à la photodiode.

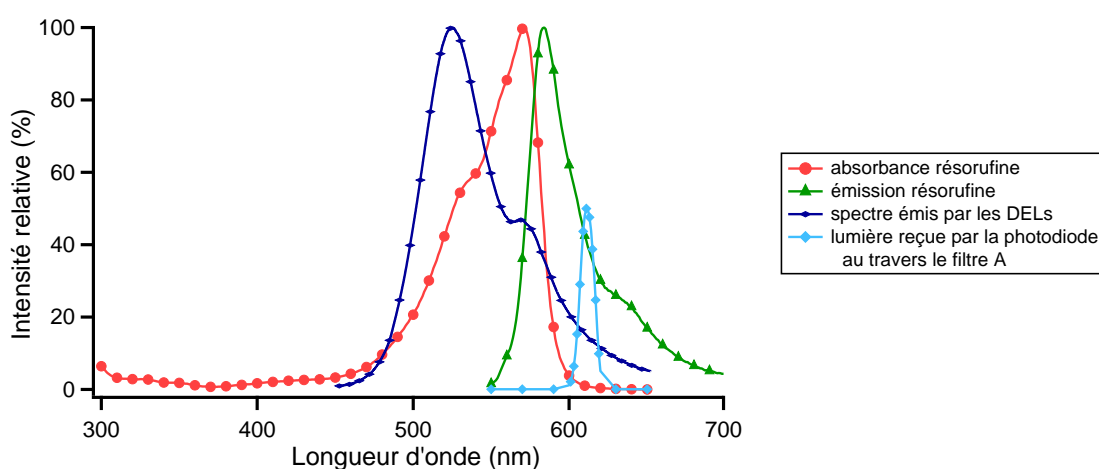


FIGURE 4.13 – Courbe représentant le spectre d'émission des LEDs et le spectre détecté par les photodiodes au travers le filtre A.

La transmittance optique de ces filtres était de 50%, ce qui est peu. En effet, la moitié des photons émis sont absorbés par le filtre, la plage de tension alors fournie par la photodiode est faible. La résolution du DaqMx (convertisseur analogique/numérique) étant liée à la plage de tension de mesure, plus la plage est faible plus la résolution de la conversion l'est également. Afin d'améliorer la résolution de conversion, nous avons remplacé les filtres A par des filtres de très bonne qualité (filtre B), et rajouté des filtres d'excitation, pour avoir une plage de tension mesurable plus grande. Les spectres théoriques de transmission de ces deux filtres sont proches mais ne se recouvrent pas. De plus, leur transmittance théorique est de l'ordre de 99%.

Nous avons alors effectué une comparaison, par expérimentation, des deux filtres. Nous avons, pour cela, préparé quatre échantillons de milieu M9 avec différentes concentrations en carbone organique. Les résultats regroupés en figure 4.14 montrent que les courbes suivent globalement la même dynamique quel que soit le filtre utilisé.

Nous remarquons, par ailleurs, que l'intensité lumineuse mesurée par les photodiodes est 10 fois plus importante avec les filtres B qu'avec le filtre A. Ce gain permet d'obtenir une plus grande résolution de

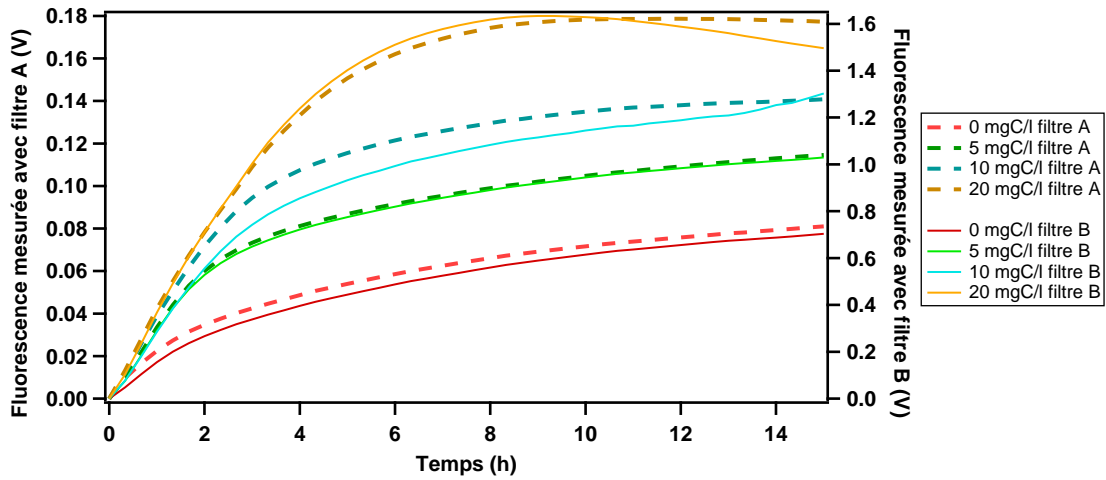


FIGURE 4.14 – Comparaison des filtres optiques sur quatre échantillons.

conversion, et donc une plus grande résolution de mesure de concentration en carbone organique.

4.2 Évaluation de la charge carbonée par une approche théorique

Nous venons de montrer qu'une mesure de DBO était en principe possible moyennant une exploration des effets de certains facteurs d'influences sur les cinétiques de dégradation : influence des concentrations en carbone, effets de la température, effets parasites de la diffusion de l'oxygène de l'air,... Malgré les précautions prises et la maîtrise des processus de fabrication et des tests expérimentaux, beaucoup de facteurs rentrent en jeu dans la détermination d'une DBO pertinente. La volonté d'obtenir une lecture rapide et différenciée de polluants organiques par l'entremise de bactéries spécialisées confinées dans un microsystème, nécessite alors une connaissance approfondie de tous les paramètres entrant en jeu. C'est la raison pour laquelle nous avons consacré une partie de notre travail de thèse à introduire un modèle théorique à partir duquel nous pourrions non seulement établir une démarche expérimentale, mais également étudier les paramètres d'influence agissant sur les résultats des tests. Pour ce faire, nous allons nous appuyer sur les équations de croissance bactérienne présentées dans le chapitre 1.

4.2.1 Expression de l'intensité de fluorescence de la résorufine par un modèle bio-phénoménologique

Quel que soit le modèle de croissance bactérienne étudié, la relation entre la variation de la concentration en substrat S (g L^{-1}) et la variation de la biomasse X (cell/L) s'écrit :

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\text{cell}/C}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (4.1)$$

Chapitre 4. Résultats expérimentaux et interprétations

Le substrat S désigne une source de carbone présente dans l'échantillon. Le coefficient $Y_{cell/C}$ décrit le taux de conversion du carbone organique en biomasse.

L'équation 4.1 sera la base des modèles que nous développerons pour décrire la production de fluorescence via la résorufine.

Nous avons vu, dans le chapitre 1, que durant la respiration cellulaire, la matière organique est oxydée et l'oxygène est réduit. L'oxygène joue dans ce cas le rôle d'accepteur d'électrons et la matière organique joue le rôle de donneur d'électrons.

Tout comme l'oxygène, la résazurine joue le rôle d'accepteur d'électrons lors du processus de biodégradation par les bactéries. Elle se trouve alors réduite en résorufine, qui émet un signal de fluorescence lorsqu'elle est excitée par une lumière.

Pour traduire ce lien entre la matière organique oxydée et la fluorescence émise par la résorufine produite suite à la biodégradation, nous avons défini un coefficient $K_{V/C}$ reliant la tension électrique V fournie par la photodiode à la quantité de carbone organique S consommée.

En intégrant le terme $K_{V/C}$ dans l'équation 4.1, celle-ci s'écrit alors :

$$\frac{dV}{dt} = -K_{V/C} \frac{dS}{dt} = K_{V/C} \frac{1}{Y_{cell/C}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (4.2)$$

Vient alors le modèle permettant de suivre le processus de biodégradation en mesurant la fluorescence produite, en utilisant le modèle exponentiel :

$$V(t) = V(0) + \frac{K_{V/C}}{Y_{cell/C}} \cdot X_0 \cdot (e^{\mu t} - 1) \quad (4.3)$$

Avec $V(0)$ (V), la fluorescence initiale mesurée par la photodiode, X_0 la population bactérienne initiale et μ le taux de croissance spécifique.

Si nous utilisons le modèle de Verhulst, présenté dans le chapitre 1, pour décrire la croissance de la population bactérienne, alors la solution de l'équation différentielle 4.2 s'écrit :

$$V(t) = V(0) + \frac{K_{V/C}}{Y_{cell/C}} \cdot X_0 \cdot \left(\frac{X_M}{X_0 + (X_M - X_0) \cdot e^{-\mu t}} - 1 \right) \quad (4.4)$$

Avec X_M la population bactérienne qui sera atteinte lorsque la matière organique sera totalement dégradée.

4.2.2 Étude des paramètres des modèles

Les deux modèles, exponentiel et de Verhulst, décrivent l'évolution de la population bactérienne au cours du temps. Nous les avons utilisés pour décrire la cinétique de consommation de l'oxygène

4.2. Évaluation de la charge carbonée par une approche théorique

dissous ou la cinétique de production de résorufine. Nous y avons introduit plusieurs paramètres tels que le rendement de la biomasse produite par unité de carbone organique ($Y_{cell/C}$) et le coefficient de fluorescence produite par unité de carbone organique dégradé ($K_{V/C}$).

4.2.2.1 Rendement de biomasse produite par carbone organique dégradé $Y_{cell/C}$

Le coefficient $Y_{cell/C}$ décrit la masse de cellules vivantes créée par quantité de carbone organique dégradé. En faisant l'hypothèse que ce coefficient est constant, cela implique une proportionnalité avec le substrat consommé, $Y_{cell/C}$ s'écrit :

$$Y_{cell/C} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (4.5)$$

Où, S est la concentration en substrat limitant dans le milieu à un instant quelconque, S_0 sa concentration initiale, X la concentration en biomasse à un instant quelconque et X_0 sa concentration initiale.

Le rendement va probablement varier en fonction du substrat et de la souche bactérienne considérée mais nous n'avons pas évalué ce paramètre expérimentalement et nous devons nous baser sur les données issues de production scientifique. Nous allons nous intéresser uniquement à la souche *Escherichia Coli* et au glucose en tant que substrat. Nous avons relevé différentes valeurs du rendement dans les productions scientifiques. Nous avons pris pour valeur de départ une moyenne des valeurs mesurées par Kayser et. al [Kayser et al., 2005] dans des conditions de cultures semblables aux nôtres. La valeur ainsi admise est de 0,54 gramme de biomasse produite pour 1 gramme de glucose consommé.

Toutes les expériences menées sont exprimées en fonction d'une concentration en carbone organique, et non pas en fonction de la concentration en glucose. La masse du glucose ($C_6H_{12}O_6$) est composée à 40% de carbone. Le rendement en terme de glucose consommé peut être ramené en carbone, ainsi $Y_{cell/C} = 0,54 \times 0,4 = 0,216$ g de biomasse par gramme de carbone. Finalement, nous pouvons l'exprimer en fonction de la population de bactéries produite dont la masse moyenne de la bactérie *E. Coli* est de l'ordre de $9,5 \cdot 10^{-13}$ g [Bionumbers - The database of useful biological numbers,]. Le rendement devient donc $Y_{cell/C} = 0,216 / 9,5 \cdot 10^{-13} = 227,368 \cdot 10^9$ bactéries produites par gramme de carbone dégradé.

4.2.2.2 Coefficient de conversion du carbone organique oxydé en intensité lumineuse $K_{V/C}$

Lors de la croissance bactérienne dans un milieu contenant de la résazurine, pour chaque molécule carbonée oxydée, une quantité de molécules de résazurine est réduite en molécules de résorufine. Une fois excitée par un faisceau lumineux, cette molécule libère son énergie en émettant un photon. Nous pouvons alors définir un coefficient $K_{V/C}$, décrivant la conversion du carbone organique oxydé en une intensité lumineuse mesurée par une photodiode. Le coefficient de conversion $K_{V/C}$ ne peut être estimé qu'expérimentalement car il dépend étroitement de la sensibilité du photodétecteur, de la

source de lumière et des filtres optiques utilisés.

Le coefficient de conversion du carbone organique oxydé en intensité de fluorescence ($K_{V/C}$) peut être évalué lors de la phase stationnaire de la cinétique de dégradation du carbone. C'est-à-dire, lorsque la population X a atteint sa valeur maximale X_M , ou autrement dit, lorsque $\exp(-\mu t) = 0$. De ce fait l'équation 4.4 s'écrit, pour $t = +\infty$:

$$V(\infty) = V(0) + \frac{K_{V/C}}{Y_{cell/C}} \cdot (X_M - X_0) \quad (4.6)$$

Et sachant que la population finale peut se voir comme étant la quantité de biomasse produite avec la quantité de carbone organique disponible additionnée à la population initiale, de manière mathématique cela signifie que $X_M = X_0 + Y_{cell/C} \cdot S_0$, avec S_0 la concentration initiale en carbone organique. Et en posant $V(0) = 0$, l'équation 4.6 devient :

$$V(\infty) = K_{V/C} \cdot S_0 \quad (4.7)$$

L'étude expérimentale de ce coefficient sera plus longuement décrite dans la partie 4.2.3 consacrée à l'étude de la modélisation sur la mesure de la fluorescence.

4.2.3 Application à la fluorescence de la résorufine

Les courbes présentées en figure 4.11 indiquent une première phase de dégradation constante du substrat, suivie d'une phase de ralentissement, puis finalement d'une phase stationnaire qui indique la fin de la réaction de biodégradation. L'équation du suivi de la fluorescence basée sur le modèle de Verhulst est appropriée à ces courbes, car elle décrit bien les différentes phases. Le modèle comporte cependant de nombreux paramètres qu'il faut estimer. Certains d'entre eux ont été évalués de manière théorique, mais comme nous l'avons déjà vu, la théorie ne s'applique pas forcément à la pratique.

4.2.3.1 Approximation des paramètres du modèle de Verhulst

Dans un premier temps, nous pouvons réécrire l'équation différentielle de Verhulst afin d'en extraire le paramètre μ . Ainsi, une forme de l'équation 1.5 (chapitre 1) peut être :

$$\int \frac{X_M}{X \cdot (X_M - X)} dX = \int \mu \cdot dt \quad (4.8)$$

La solution de cette équation peut se mettre sous la forme :

$$\ln\left(\frac{X}{X_M - X}\right) = \mu \cdot t + \ln\left(\frac{X_0}{X_M - X_0}\right) \quad (4.9)$$

Le détail du calcul menant de l'équation différentielle de Verhulst à la solution présentée ci-dessus est détaillé en annexe.

4.2. Évaluation de la charge carbonée par une approche théorique

La forme affine de cette équation permet d'extraire facilement le taux de croissance bactérien μ . Nous ne connaissons ici que X_0 , X étant la concentration bactérienne à chaque instant t , et X_M la concentration bactérienne finale. Tel quel, nous ne pouvons évaluer μ . Cependant, nous pouvons voir, d'après l'équation 4.2 et les courbes expérimentales, que les signaux de fluorescence observés ne sont, finalement, que l'image de la croissance bactérienne, liée par le rapport $K_{V/C}/Y_{cell/C}$. En remplaçant les termes X par V , la fluorescence mesurée à chaque instant t , X_0 par V_0 et X_M par V_M , l'équation 4.9 devient alors :

$$\ln\left(\frac{V}{V_M - V}\right) = \mu \cdot t + \ln\left(\frac{V_0}{V_M - V_0}\right) \quad (4.10)$$

Où nous connaissons tous les paramètres V , V_0 et V_M obtenus des courbes expérimentales.

La fonction décrivant 4.10 a été appliquée aux courbes présentées dans la figure 4.11, dont le résultat graphique est indiqué en figure 4.15.

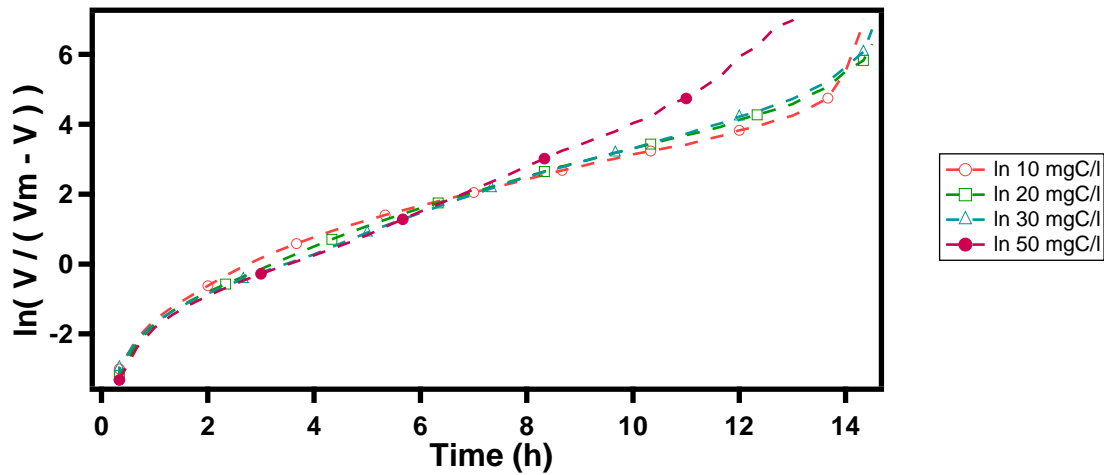


FIGURE 4.15 – Représentation des courbes de 10, 20, 30 et 50 mgC/l.

La pente de la partie linéaire des courbes représente le taux de croissance μ de la population bactérienne, qui semble être du même ordre de grandeur pour tous les échantillons testés. Il y a cependant une légère variation, ce qui semble corroborer avec de nombreux articles de la littérature traitant de la relation entre le taux de croissance et la concentration en substrat [Wang et al., 2007].

Nous avons estimé μ pour chaque courbe de la figure et les avons regroupés dans le tableau 4.1.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 4.2.2.2 expliquant le coefficient $K_{V/C}$, il peut être facilement calculé grâce au rapport suivant :

$$K_{V/C} = \frac{S_0}{V(\infty)} \quad (4.11)$$

Où S_0 est la concentration initiale en carbone organique, et $V(\infty)$ est la fluorescence mesurée à la fin

Chapitre 4. Résultats expérimentaux et interprétations

Concentration initiale en carbone	10 mgC/l	20 mgC/l	30 mgC/l	50 mgC/l
$a : \mu(h^{-1})$	0,37214	0,44023	0,4911	0,63029
$b : \ln\left(\frac{V_0}{V_M - V_0}\right)$	-0,59703	-1,0923	-1,5808	-2,2459

TABLEAU 4.1 – Coefficients de la régression linéaire des courbes de la figure 4.15

de l'expérience.

Nous pouvons donc calculer $K_{V/C}$ pour chaque courbe. Les valeurs des coefficients $V(\infty)$ et $K_{V/C}$ sont résumées dans le tableau 4.2.

Concentration initiale en carbone S_0 (gC/l)	0,01	0,02	0,03	0,05
$V(\infty)$ (mV)	131,81	161,81	171,79	189,35
$K_{V/C}$ (mV/gC)	13181	8090,5	5726,3	3787

TABLEAU 4.2 – Valeurs des coefficients utilisés pour calculer $K_{V/C}$ pour chaque courbe de la figure 4.11

Nous ne pouvons évaluer la valeur du coefficient du rendement du carbone organique en biomasse ($Y_{cell/C}$) avec les seules équations et données expérimentales que nous possédons. Pour cela, il nous aurait fallu avoir le suivi de la biomasse. Seul un ajustement des équations sur les courbes expérimentales nous permet d'estimer cette valeur. Nous avons donc utilisé le logiciel Igor Pro pour réaliser cette étape.

X_M dans l'équation 4.4 a été remplacé par $X_0 + Y_{cell/C} \times S_0$, et $K_{V/C}$ et μ par leurs valeurs précédemment calculées.

Le résultat des ajustements des quatre concentrations (10, 20, 30 et 50 mgC/l) avec le modèle de Verhulst pour obtenir le paramètre $Y_{cell/C}$ est résumé dans le tableau 4.3. Seul le paramètre que nous souhaitions estimer, $Y_{cell/C}$, était variable.

La figure 4.16 reprend les courbes expérimentales étudiées avec leurs courbes théoriques ajustées.

Nous observons toutefois une variabilité non négligeable de l'ajustement, notamment pour les courbes 10 et 50 mgC/l. Cette variabilité est due à une estimation approximative de la valeur de μ .

4.2. Évaluation de la charge carbonée par une approche théorique

Concentration initiale en carbone S_0 (gC/l)	0,01	0,02	0,03	0,05
$Y_{cell/C}$ (cell/gC)	$4,3742.e^9$	$6,2604.e^9$	$6,7005.e^9$	$9,06.e^9$

TABLEAU 4.3 – Valeurs de $Y_{cell/C}$ pour les quatre concentrations en carbone organique 10, 20, 30 et 50 mgC/l.

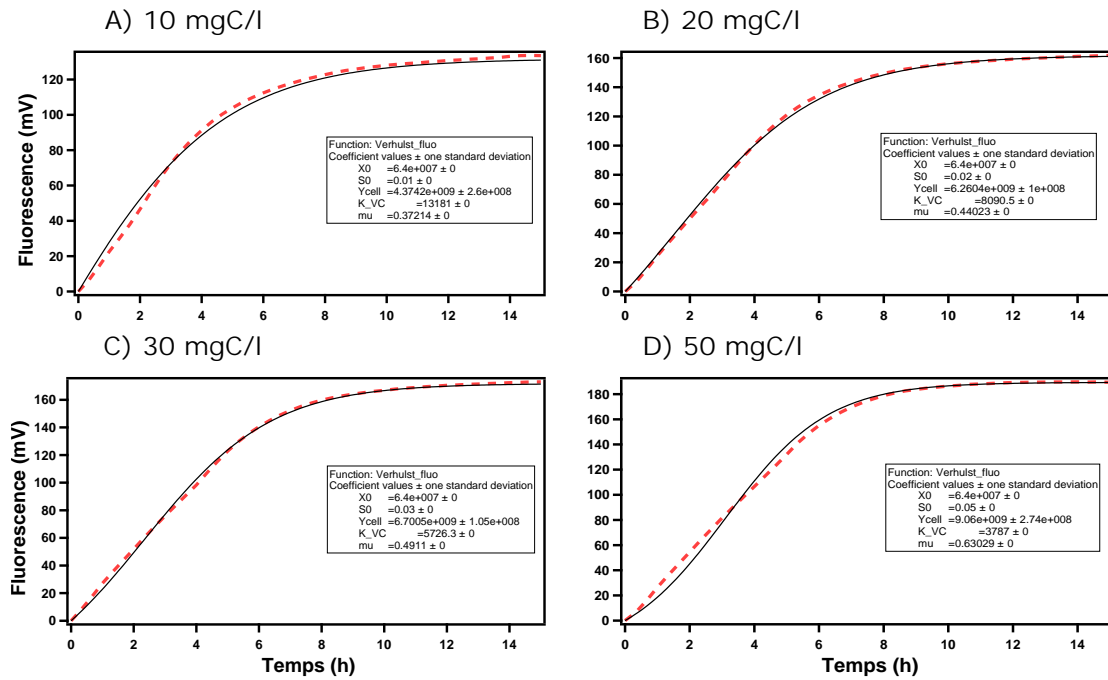


FIGURE 4.16 – Courbes expérimentales montrant la dégradation bactérienne de 10 (A), 20 (B), 30 (C) et 50 (D) mgC/l avec leurs courbes d'ajustement respectives, dont le seul coefficient variable est $Y_{cell/C}$.

4.2.3.2 Évaluation des paramètres du modèle de Verhulst à charge carbonée variable

Nous avons calculé, précédemment, les valeurs de $K_{V/C}$, μ et $Y_{cell/C}$. Étudions, maintenant, leur variation en fonction de la concentration initiale en carbone organique S_0 .

Le tracé de μ en fonction de S_0 indique une relation linéaire (Figure 4.17) :

$$\mu(S_0) = 0,30759 + 6,3944 \cdot S_0 \quad (4.12)$$

Le tracé de la courbe (Figure 4.18) $K_{V/C}$ en fonction de la concentration initiale en carbone S_0 indique une relation de type exponentielle entre les deux :

$$K_{V/C}(S_0) = 3211,4 + 20090 \cdot e^{70,193 \cdot S_0} \quad (4.13)$$

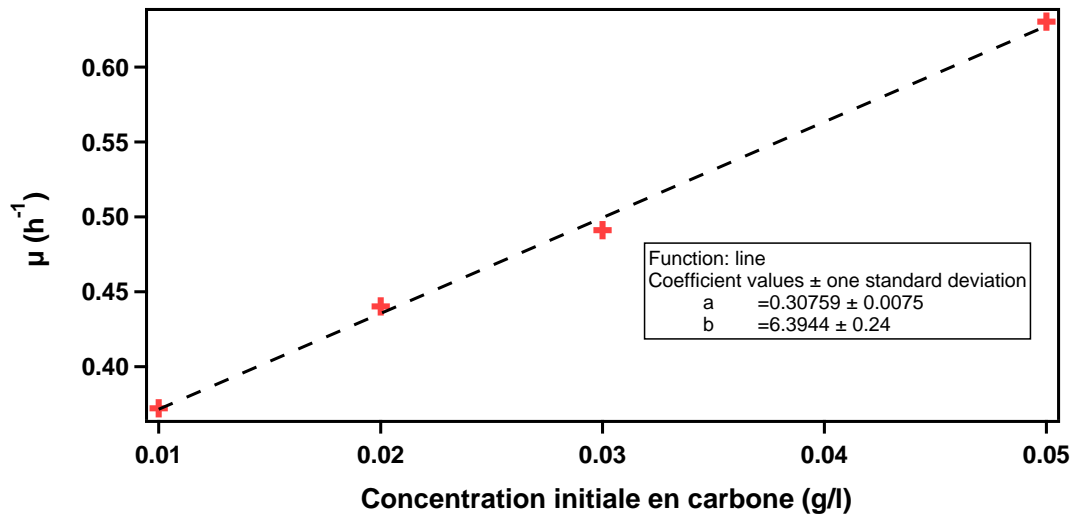


FIGURE 4.17 – Graphique représentant la relation linéaire entre μ et S_0 .

Relation toutefois bornée dans la gamme 10 mgC/l – 50 mgC/l. En effet, dans les faibles concentrations (<10 mgC/l), le coefficient $K_{V/C}$ ne peut être indéfiniment une fonction exponentielle, il existe très certainement une limite dans sa valeur.

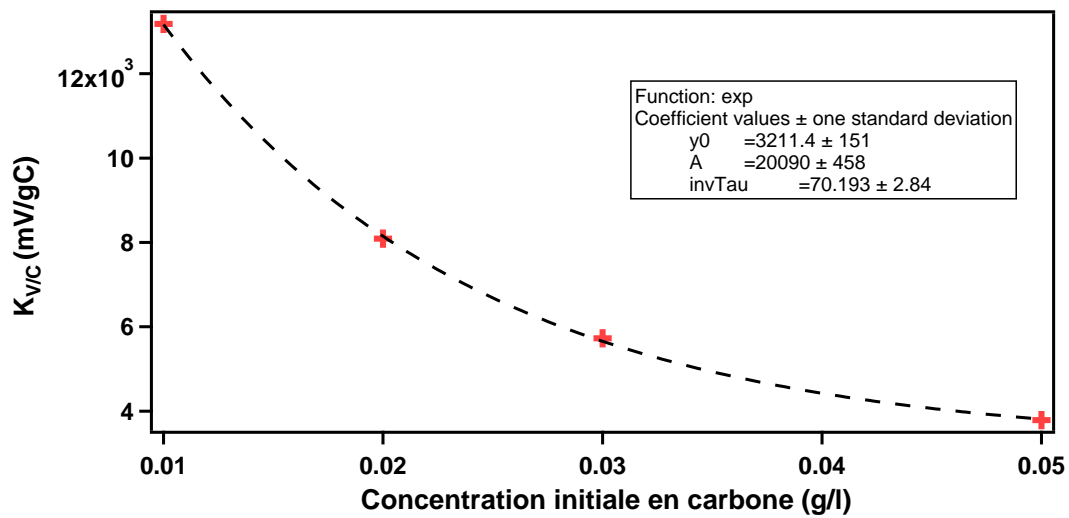


FIGURE 4.18 – Graphique représentant la relation puissance entre $K_{V/C}$ et S_0 .

Finalement, la relation entre $Y_{cell/C}$ et S_0 (Figure 4.19) peut être définie comme étant une fonction puissance :

$$Y_{cell/C}(S_0) = 1,2726 \cdot 10^9 + 3,4224 \cdot 10^{10} \cdot S_0^{0,49143} \quad (4.14)$$

Nous venons d'évaluer les paramètres variables du modèle de Verhulst appliqué au suivi de la fluores-

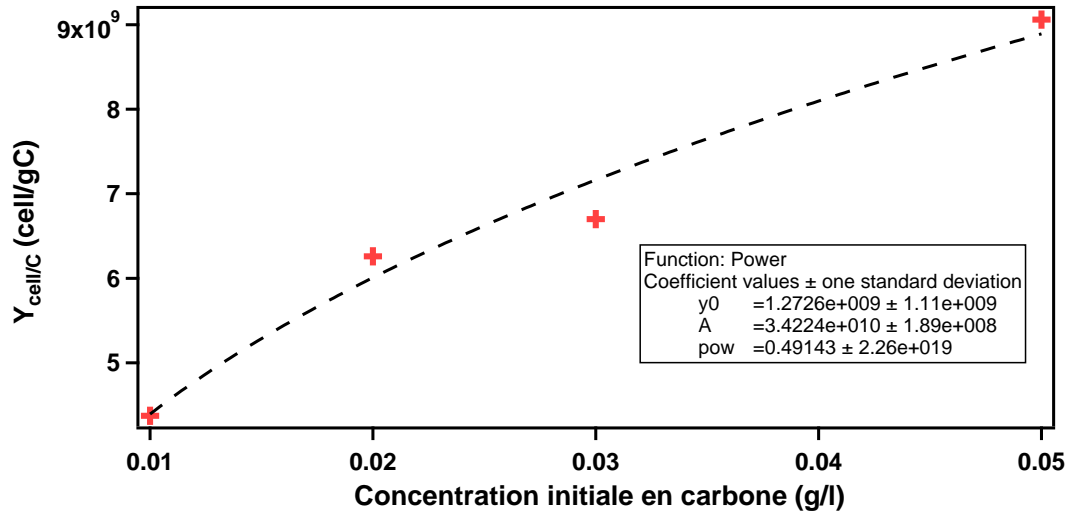


FIGURE 4.19 – Graphique représentant la relation exponentielle entre $Y_{cell/C}$ et S_0 .

cence de la résorufine, en fonction de la concentration initiale en carbone organique. Les fonctions mathématiques déduites de cette étude donnent une bonne corrélation avec la concentration en carbone S_0 . En appliquant ces nouvelles fonctions au modèle de Verhulst (4.4), nous obtenons alors un modèle dont le seul paramètre inconnu est S_0 . Cependant, la corrélation de la nouvelle équation de Verhulst, aux données expérimentales, ne permet pas d'obtenir une valeur de S_0 suffisamment proche de la valeur réelle. A ce stade de l'étude, les fonctions mathématiques proposées ne sont pas encore assez précises. Elles nécessitent d'être étudiées avec plus de temps, plus d'attentions et d'être validées expérimentalement avec de nouvelles expériences.

4.2.4 Quels paramètres pour la prédiction de la DBO ?

Dans les expériences menées avec la résazurine, les pentes au début de l'expérience sont toutes identiques, impossible alors d'utiliser le modèle exponentiel pour déterminer dans les premières heures la charge carbonée de l'échantillon. S'impose alors à nous, l'utilisation d'un modèle plus complexe faisant apparaître une limitation de la croissance bactérienne par le substrat. L'extraction simple d'un paramètre représentatif de la charge carbonée est, alors, délicate. En effet, quatre des cinq paramètres composant l'équation 4.4 sont fonction de la concentration en carbone S_0 . Une relation avec S_0 existe pour chacun de ces quatre paramètres, cependant l'extraction de S_0 , indiquant la charge carbonée de l'échantillon, est impossible par une arithmétique simple. L'utilisation d'algorithme de régression est donc nécessaire.

4.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats de nos expériences menées sur des dispositifs « macro » puis sur des biopuces, soit avec une optode intégrée, soit avec la résazurine. D'une manière générale, le principe de pouvoir accéder à une mesure de la DBO, par suivi d'une culture bactérienne, est bien établi mais avec des exigences fortes de contrôle des conditions expérimentales.

Nous validons, aussi, les technologies que nous avons préconisé dans le chapitre 3, c'est-à-dire les biopuces à base de PDMS/verre, avec ou sans optode, et les lecteurs de fluorescence associés. Une étude des phénomènes observés a été menée avec des modèles théoriques, avec pour objectif d'anticiper l'estimation de la DBO, ou plus directement de la charge carbonée de l'échantillon.

Nous avons constaté que la mesure de l'oxygène, avec les optodes, est délicate car l'oxygène est très largement présent dans l'atmosphère environnante et diffuse assez facilement dans la chambre de mesure. Cet effet est d'autant plus important en micro-volume que, d'une part le matériau PDMS, utilisé ici, est poreux et d'autre part, le rapport de surface d'échange gazeux est relativement plus grand dans le microsystème. La mesure de la consommation de l'oxygène dissous ne peut se faire correctement que lorsque les échanges gazeux sont maîtrisés.

La mesure de la fluorescence de la résorufine, molécule issue de la réduction de la résazurine, permet de suivre la dégradation de la matière carbonée par les bactéries. De ce fait, la diffusion de l'oxygène n'est plus un problème pour la modélisation, et n'est pas un facteur limitant pour la mesure.

Le système de lecture de la fluorescence, réalisé avec des composants conventionnels, est bien miniaturisé et fournit des résultats tout à fait satisfaisants. Il est donc possible de réaliser une mesure de la charge carbonée à moindre coût en associant une biopuce et un lecteur miniaturisé. Nous avons vu également que l'utilisation de filtre de qualité permet d'obtenir une meilleure sensibilité de la mesure.

Nous avons choisi d'appliquer le modèle de Verhulst, car la limitation par le substrat est visible via la fluorescence. Le modèle exponentiel n'est dans notre cas pas utilisable car les cinétiques du début de l'expérience ne sont pas différenciables, quel que soit l'échantillon. Le modèle de Verhulst ne nous permet pas, actuellement, d'estimer correctement la charge carbonée de l'échantillon. Car, la quasi-totalité des paramètres d'identification sont fonctions de la concentration en carbone organique. Nous devons encore étudier ces paramètres, et leurs interactions entre eux, afin d'obtenir une équation plus précise du suivi de la fluorescence.

Malgré cela, avec des conditions expérimentales adaptées, le temps de biodégradation peut être réduit à une douzaine d'heures. Le niveau de fluorescence peut, alors, être mesuré, et à l'aide d'un abaque liant la fluorescence à la concentration en carbone organique dégradé, nous pourrions déterminer la charge carbonée de l'échantillon en moins de cinq jours, seulement 12 h !

Nous avons noté que, pour les faibles concentrations en carbone organique (5 à 10 mgC/L), il existe

un mécanisme supplémentaire se rajoutant à la dégradation de la matière carbonée qui est rendu visible grâce à la fluorescence. En effet, une augmentation de la fluorescence apparaît au bout de quelques heures lorsque la totalité du carbone semble avoir été dégradé. Cela peut s'expliquer par un changement du comportement des bactéries qui rentrent en mode de survie et consomment alors leurs propres réserves emmagasinées au cours de leur croissance. Cet effet est d'autant plus visible que la concentration en carbone est faible, c'est pourquoi la fluorescence de l'échantillon contenant 0 mg de carbone augmente, malgré tout, au cours du temps. La modélisation devra donc intégrer ce phénomène pour rendre compte des courbes aux faibles charges carbonées, mais cela n'a pas été développé au cours de cette thèse.

Conclusion générale et perspectives

Comme nous l'avons vu, en introduction de cette thèse, la qualité de l'eau rejetée dans les cours d'eau est particulièrement contrôlée, pour des raisons écologiques et sanitaires évidentes. Elle est évaluée via la mesure normalisée de la DBO_5 (Demande Biologique en Oxygène). Cependant, nous avons recensé certaines limites de viabilité et de précision des techniques qui y sont décrites. Les travaux de cette thèse avaient donc pour ambition de proposer une méthode de mesure alternative, plus précise et moins chronophage. Ils ont permis de traiter de la conception et de la réalisation de prototypes de bio-puces à bactéries destinées à la mesure de la DBO d'un échantillon d'eau. Adossée à une instrumentation spécifique, notre approche a consisté à les constituer en réseau et à les associer à un lecteur « portable » pour pouvoir effectuer des mesures ambulatoires sur site.

Dans cette thèse, nous avons traité de la conception et du prototypage d'un microsystème destiné à la mesure de la DBO d'un échantillon d'eau. Ses parties principales comportent des biopucesensemencées en bactéries et un lecteur de fluorescence. L'originalité de notre approche est d'explorer la voie des biopuces à bactéries associée à un lecteur « portable » pour pouvoir effectuer des mesures sur site.

Compte tenu des résultats obtenus, nous pouvons apporter des réponses à plusieurs des questions que nous nous posions en introduction. Avec les choix technologiques que nous avons appliqués, nous pouvons conclure que les technologies PDMS/verre sont compatibles avec la croissance et la vie bactérienne. De plus, elles peuvent être adaptées facilement, pour recevoir des capteurs embarqués, tels que les capteurs d'oxygène dissous. La mesure de DBO par voie de culture bactérienne est donc possible et les résultats obtenus sur puce miniaturisée sont comparables aux mesures obtenues sur système macro.

Ce sont des résultats encourageants qui invitent à poursuivre les efforts dans cette voie. Les points difficiles, pour certains, relèvent de la biologie : il faut améliorer les procédures et les contrôles biologiques pour assurer une complète reproductibilité des résultats d'essais.

En ce qui concerne les aspects matériaux et technologiques des bio-puces, la filière verre/PDMS que nous avons développée semble adaptée à des mesures de DBO, non seulement pour des mesures ponctuelles mais également en réseaux pour des détections multi-espèces. Elle a permis de montrer que les

Conclusion générale et perspectives

résultats obtenus sont comparables à ceux des méthodes plus classiques, ce qui valide l'approche de miniaturisation que nous avons initiée. Néanmoins, cette filière n'est pas adaptée à une production industrielle : les procédés de polymérisations sont trop lents pour pouvoir fabriquer des biopuces en série.

Concernant le capteur de DBO, nous avons exploré deux options. L'une utilise une optode intégrée dans le processus de fabrication de la biopuce pour suivre la teneur en oxygène dissous. L'autre utilise la résazurine, en exploitant le fait qu'elle devient fluorescente lorsqu'elle est réduite pendant le processus de biodégradation

Fonctionnellement, le choix de mesure de la concentration d'oxygène par des optodes a révélé des problèmes liés à la non herméticité des puits. La dynamique de diffusion de l'air emprisonné, et notamment de l'oxygène, au travers des couches PDMS, peut introduire des biais ou même fausser les mesures de DBO. Nous avons expérimenté des voies de correction, par exemple en étanchéifiant les parois en PDMS avec des fines couches de SU8, sans arriver à un résultat entièrement satisfaisant ; mais ce point doit encore être approfondi.

La deuxième option est technologiquement plus simple, et donc attrayante, car elle ne nécessite pas d'étanchéifier les puits de mesure. Cependant, il existe, peut-être, une compétition d'utilisation entre l'oxygène dissous et la résazurine. Les résultats obtenus sont en adéquation avec les objectifs visés, mais il restera à traiter en profondeur les aspects liés au métabolisme des bactéries.

En parallèle avec ces développements technologiques et des caractérisations en DBO, un autre point a été abordé dans le cadre de cette thèse. Il s'agit de la modélisation fine des mécanismes de croissance bactériens et de leurs interactions, par le biais de la réduction de la résazurine, avec leur milieu de culture. Nous avons exploité les modèles courants mais, si l'on veut accélérer et mieux interpréter les mesures, il faut multiplier les essais selon un plan d'expérience et paramétrer les modèles avec plus de précision.

Au bilan de notre travail, nous avons conçu et réalisé un ensemble fonctionnel biopuce-lecteur de fluorescence. Son fonctionnement a été validé en laboratoire, mais les validations en site réel restent à effectuer.

Les technologies biopuce doivent être améliorées pour permettre des fabrications en série. Plusieurs voies technologiques peuvent être envisagées. Des technologies de microfabrication collectives, sur la base de résines, telles que la SU8, sont envisageables, mais restent encore très coûteuses. Une autre possibilité, nous semble-t-il plus adaptée, est la réalisation de dispositifs en plastique thermoformé.

Il reste encore un travail conséquent à faire pour développer la modélisation, afin d'en extraire au mieux, et au plus tôt, un paramètre représentatif de la qualité de l'eau.

Il est possible de parfaire les technologies fluidiques et progresser dans l'intégration sur puces de fonctions multiples : injections de fluides, mélanges, lavages, dilutions, etc. . .

En ce qui concerne la biologie, certains points restent à améliorer, par exemple les protocoles de conservation des inoculums bactériens et leur réanimation dans le milieu de test, afin de minimiser le taux de mortalité des populations.

Sur un plan plus général, nous avons montré la faisabilité de la filière biopuce portant des cultures bactériennes. Il est possible d'en étendre le champ applicatif en recherchant et en inventoriant toutes les applications possibles dans les contrôles/commandes de procédés bio-chimiques et dans les analyses toxicologiques (Santé et Environnement).

Bibliographie

- [A.P.H.A. American Public Health Association and Greenberg, Arnold E and Trussell et al., 1986]
A.P.H.A. American Public Health Association and Greenberg, Arnold E and Trussell, R. R., Clesceri, L. S., Franson, M. A. H., Association, A. W. W., and Federation, W. P. C. (1986). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, D.C. : American Public Health Association, 16th ed edition.
- [Arlyapov et al., 2012] Arlyapov, V., Kamanin, S., Ponamoreva, O., and Reshetilov, A. (2012). Biosensor analyzer for BOD index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *Candida blankii*, and *Debaryomyces hansenii*. *ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY*, 50(4-5) :215–220.
- [Avila et al., 2011] Avila, K., Moxey, D., de Lozar, A., Avila, M., Barkley, D., and Hof, B. (2011). The onset of turbulence in pipe flow. *Science*, 333(6039) :192–196.
- [Bang et al., 2004] Bang, H., Lim, S., Lee, Y., Chung, S., Chung, C., Han, D., and Chang, J. (2004). Serial dilution microchip for cytotoxicity test. *JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING*, 14(8) :1165–1170.
- [Baronian et al., 2002] Baronian, K., Downard, A., Lowen, R., and Pasco, N. (2002). Detection of two distinct substrate-dependent catabolic responses in yeast cells using a mediated electrochemical method. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 60(1-2) :108–113.
- [Beltran et al., 1997] Beltran, F., Garcia-Araya, J., and Alvarez, P. (1997). Impact of chemical oxidation on biological treatment of a primary municipal wastewater. 1. Effects on COD and biodegradability. *OZONE-SCIENCE & ENGINEERING*, 19(6) :495–512.
- [Bennetto et al., 1983] Bennetto, H., Stirling, J., Tanaka, K., and Vega, C. (1983). ANODIC REACTIONS IN MICROBIAL FUEL-CELLS. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 25(2) :559–568.
- [Bertani, 1951] Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62(3) :293–300.
- [Bertani, 2004] Bertani, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century : P1, P2, and other experimental systems. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 186(3) :595–600.
- [Bionumbers - The database of useful biological numbers,] Bionumbers - The database of useful biological numbers. Composition chimique d'une bactérie *E. Coli*. <http://kirschner.med.harvard.edu/>

Bibliographie

- files/bionumbers/Composition%20of%20an%20average%20E.%20coli%20Br%20cell-Neudhart.pdf.
- [Blok and Booy, 1984] Blok, J. and Booy, M. (1984). BIODEGRADABILITY TEST-RESULTS RELATED TO QUALITY AND QUANTITY OF THE INOCULUM. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY*, 8(5) :410–422.
- [Buchanan, 1918] Buchanan, R. E. (1918). Life phases in a bacterial culture. *The Journal of Infectious Diseases*, 23(2) :pp. 109–125.
- [Caldwell and Langelier, 1948] Caldwell, D. H. and Langelier, W. F. (1948). Manometric measurement of the biochemical oxygen demand of sewage. *Sewage works journal*, 20(2) :202–218.
- [Catterall et al., 2001] Catterall, K., Morris, K., Gladman, C., Zhao, H., Pasco, N., and John, R. (2001). The use of microorganisms with broad range substrate utilisation for the ferricyanide-mediated rapid determination of biochemical oxygen demand. *TALANTA*, 55(6) :1187–1194.
- [Catterall et al., 2003] Catterall, K., Zhao, H., Pasco, N., and John, R. (2003). Development of a rapid ferricyanide-mediated assay for biochemical oxygen demand using a mixed microbial consortium. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 75(11) :2584–2590.
- [Chan et al., 2000] Chan, C., Lehmann, M., Chan, K., Chan, P., Chan, C., Gruendig, B., Kunze, G., and Renneberg, R. (2000). Designing an amperometric thick-film microbial BOD sensor. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 15(7-8) :343–353.
- [Chang et al., 2004] Chang, I., Jang, J., Gil, G., Kim, M., Kim, H., Cho, B., and Kim, B. (2004). Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 19(6) :607–613.
- [Chee et al., 1999a] Chee, G., Nomura, Y., Ikebukuro, K., and Karube, I. (1999a). Development of highly sensitive BOD sensor and its evaluation using preozonation. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, 394(1) :65–71.
- [Chee et al., 2001] Chee, G., Nomura, Y., Ikebukuro, K., and Karube, I. (2001). Biosensor for the evaluation of biochemical oxygen demand using photocatalytic pretreatment. *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL*, 80(1) :15–20.
- [Chee et al., 1999b] Chee, G., Nomura, Y., and Karube, I. (1999b). Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, 379(1-2) :185–191.
- [Chiappini et al., 2010] Chiappini, S. A., Kormes, D. J., Bonetto, M. C., Sacco, N., and Corton, E. (2010). A new microbial biosensor for organic water pollution based on measurement of carbon dioxide production. *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL*, 148(1) :103–109.
- [Choi and Xiao, 1999] Choi, M. and Xiao, D. (1999). Oxygen-sensitive reverse-phase optode membrane using silica gel-adsorbed ruthenium(II) complex embedded in gelatin film. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, 387(2) :197–205.

- [Choi and Gu, 2002] Choi, S. and Gu, M. (2002). A portable toxicity biosensor using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 17(5) :433–440. 6th World International Congress on Biosensors, SAN DIEGO, CALIFORNIA, MAY 23-26, 2000.
- [Costa-Fernandez et al., 1998] Costa-Fernandez, J., Diaz-Garcia, M., and Sanz-Medel, A. (1998). Sol-gel immobilized room-temperature phosphorescent metal-chelate as luminescent oxygen sensing material. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, 360(1-3) :17–26.
- [Cronin and Schultz, 1998] Cronin, M. and Schultz, T. (1998). Structure-toxicity relationships for three mechanisms of action of toxicity to *Vibrio fischeri*. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY*, 39(1) :65–69.
- [Czekanska, 2011] Czekanska, E. M. (2011). Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. In Stoddart, M. J., editor, *Mammalian Cell Viability*, volume 740 of *Methods in Molecular Biology*, pages 27–32. Humana Press.
- [Dai et al., 2004] Dai, Y., Lin, L., Li, P., Chen, X., Wang, X., and Wong, K. (2004). Comparison of BOD optical fiber biosensors based on different microorganisms immobilized in ormosil matrixes. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY*, 84(8) :607–617.
- [Davey, 1994] Davey, K. (1994). MODELING THE COMBINED EFFECT OF TEMPERATURE AND PH ON THE RATE COEFFICIENT FOR BACTERIAL-GROWTH. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY*, 23(3-4) :295–303.
- [Dehecq and Duhamel,] Dehecq, E. and Duhamel, M. STRUCTURE DES BACTÉRIES. <http://anne.decocter.free.fr/bagene/strucba.htm>.
- [Deng et al., 2000] Deng, T., Wu, H., Brittain, S., and Whitesides, G. (2000). Prototyping of masks, masters, and stamps/molds for soft lithography using an office printer and photographic reduction. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 72(14) :3176–3180.
- [Di Lorenzo et al., 2009] Di Lorenzo, M., Curtis, T. P., Head, I. M., and Scott, K. (2009). A single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters. *WATER RESEARCH*, 43(13) :3145–3154.
- [Dudal et al., 2006] Dudal, Y., Holgado, R., Knoth, K., and Debroux, M. (2006). A fluorescence-based microplate assay to quantify DOM-induced catabolic activity. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*, 384(1) :175–179.
- [Envolure, 2006] Envolure (2006). Enverdi.
- [Gil et al., 2000] Gil, G., Mitchell, R., Chang, S., and Gu, M. (2000). A biosensor for the detection of gas toxicity using a recombinant bioluminescent bacterium. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 15(1-2) :23–30.
- [Grzebyk and Pozniak, 2005] Grzebyk, M. and Pozniak, G. (2005). Microbial fuel cells (MFCs) with interpolymer cation exchange membranes. *SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY*, 41(3) :321–328. PERMEA 2003 Conference, Tatranske Matliare, SLOVAKIA, SEP 07-11, 2003.

Bibliographie

- [Gu et al., 2002] Gu, M., Min, J., and Kim, E. (2002). Toxicity monitoring and classification of endocrine disrupting chemicals (EDCs) using recombinant bioluminescent bacteria. *CHEMOSPHERE*, 46(2) :289–294.
- [Guespin-Michel, 2012] Guespin-Michel, J. (2012). Les bactéries, leur monde et nous.
- [Gustavson et al., 1998] Gustavson, K., Svenson, A., and Harkin, J. (1998). Comparison of toxicities and mechanism of action of N-alkanols in the submitochondrial particle and the *Vibrio fischeri* bioluminescence (Microtox (R)) bioassay. *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY*, 17(10) :1917–1921.
- [Guyard,] Guyard, C. DBO5 : un paramètre qui monte. *L'eau, l'industrie, les nuisances*, (334) :51–58.
- [Hansatech Instruments,] Hansatech Instruments. *Notice technique d'un fluorimètre à base de photodiode*. Hansatech Instruments.
- [Hartmann et al., 1995] Hartmann, P., Leiner, M., and Lippitsch, M. (1995). LUMINESCENCE QUENCHING BEHAVIOR OF AN OXYGEN SENSOR-BASED ON A RU(II) COMPLEX DISSOLVED IN POLYSTYRENE. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 67(1) :88–93.
- [Hsieh et al., 2004] Hsieh, C., Tsai, M., Ryan, D., and Pancorbo, O. (2004). Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox (R) chronic toxicity test. *SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT*, 320(1) :37–50.
- [Hsieh and Chung, 2014] Hsieh, M.-C. and Chung, Y.-C. (2014). Measurement of biochemical oxygen demand from different wastewater samples using a mediator-less microbial fuel cell biosensor. *ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY*, 35(17) :2204–2211.
- [iMedecin.com,] iMedecin.com. Bactériologie - Structure des bactéries. <http://imedecin.com/Bacteriologie/bacteriologie-structure-des-bacteries.html>.
- [James H., 1965] James H., C. (1965). The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis. *Limnology and Oceanography*, 10(1) :135–140.
- [Jennings et al., 2001] Jennings, V., Rayner-Brandes, M., and Bird, D. (2001). Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*) : A comparison of three commercial systems. *WATER RESEARCH*, 35(14) :3448–3456.
- [Ji et al., 2010] Ji, S., Wu, W., Wu, W., Song, P., Han, K., Wang, Z., Liu, S., Guo, H., and Zhao, J. (2010). Tuning the luminescence lifetimes of ruthenium(II) polypyridine complexes and its application in luminescent oxygen sensing. *JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY*, 20(10) :1953–1963.
- [Jia et al., 2003] Jia, J., Tang, M., Chen, X., Li, Q., and Dong, S. (2003). Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol-gel derived composite material. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 18(8) :1023–1029.
- [Jiang et al., 2006] Jiang, Y., Xiao, L.-L., Zhao, L., Chen, X., Wang, X., and Wong, K.-Y. (2006). Optical biosensor for the determination of BOD in seawater. *TALANTA*, 70(1) :97–103. China/Japan/Korea Environmental Analytical Chemistry Symposium, Chiba, JAPAN, SEP 01-03, 2005.

- [Jouanneau et al., 2014] Jouanneau, S., Recoules, L., Durand, M.-J., Boukabache, A., Picot, V., Primault, Y., Lakel, A., Sengelin, M., Barillon, B., and Thouand, G. (2014). Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD) : A review. *WATER RESEARCH*, 49 :62–82.
- [Karube et al., 1977] Karube, I., Matsunaga, T., Mitsuda, S., and Suzuki, S. (1977). MICROBIAL ELECTRODE BOD SENSORS. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 19(10) :1535–1547.
- [Kasai and Hatakeyama, 1993] Kasai, F. and Hatakeyama, S. (1993). HERBICIDE SUSCEPTIBILITY IN 2 GREEN-ALGAE, CHLORELLA-VULGARIS AND SELENASTRUM-CAPRICORNUTUM. *CHEMOSPHERE*, 27(5) :899–904.
- [Kayser et al., 2005] Kayser, A., Weber, J., Hecht, V., and Rinas, U. (2005). Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *MICROBIOLOGY-SGM*, 151(3) :693–706.
- [Kelly et al., 1999] Kelly, C., Lajoie, C., Layton, A., and Sayler, G. (1999). Bioluminescent reporter bacterium for toxicity monitoring in biological wastewater treatment systems. *WATER ENVIRONMENT RESEARCH*, 71(1) :31–35.
- [Kim et al., 2003] Kim, B., Chang, I., Gil, G., Park, H., and Kim, H. (2003). Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *BIOTECHNOLOGY LETTERS*, 25(7) :541–545.
- [Kim et al., 1999a] Kim, B., Ikeda, T., Park, H., Kim, H., Hyun, M., Kano, K., Takagi, K., and Tatsumi, H. (1999a). Electrochemical activity of an Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. *BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES*, 13(7) :475–478.
- [Kim et al., 1999b] Kim, B., Kim, H., Hyun, M., and Park, D. (1999b). Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 9(2) :127–131.
- [Kim et al., 2002] Kim, H., Park, H., Hyun, M., Chang, I., Kim, M., and Kim, B. (2002). A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY*, 30(2) :145–152.
- [Kim et al., 2008] Kim, H. J., Jeong, Y. C., and Rhee, J. I. (2008). Encapsulation of tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) complex linked with dendrons in sol-gels : Stable optical sensing membranes for dissolved oxygen. *TALANTA*, 76(5) :1070–1076.
- [Kim and Park, 2004] Kim, M. and Park, K. (2004). Immobilization of enzymes for *Klebsiella* BOD sensor. *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL*, 98(1) :1–4.
- [Koester et al., 2006] Koester, M., Gliesche, C. G., and Wardenga, R. (2006). Microbiosensors for measurement of microbially available dissolved organic carbon : Sensor characteristics and preliminary environmental application. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 72(11) :7063–7073.
- [Kolle et al., 1997] Kolle, C., Gruber, W., Trettnak, W., Biebornik, K., Dolezal, C., Reininger, F., and OLeary, P. (1997). Fast optochemical sensor for continuous monitoring of oxygen in breath-gas analysis. *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL*, 38(1-3) :141–149. 3rd European Conference

Bibliographie

- on Optical Chemical Sensors and Biosensors (EUROPT(R)ODE III), ZURICH, SWITZERLAND, MAR 31-APR 03, 1996.
- [Kono, 1968] Kono, T. (1968). Kinetics of microbial cell growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 10(2) :105–131.
- [Kumlanghan et al., 2008] Kumlanghan, A., Kanatharana, P., Asawatreratanakul, P., Mattiasson, B., and Thavarungkul, P. (2008). Microbial BOD sensor for monitoring treatment of wastewater from a rubber latex industry. *ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY*, 42(6) :483–491.
- [Kumlanghan et al., 2007] Kumlanghan, A., Liu, J., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., and Mattiasson, B. (2007). Microbial fuel cell-based biosensor for fast analysis of biodegradable organic matter. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 22(12) :2939–2944.
- [Lagarde and Jaffrezic-Renault, 2011] Lagarde, F. and Jaffrezic-Renault, N. (2011). Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*, 400(4) :947–964.
- [Learoyd et al., 1992] Learoyd, S., Kroll, R., and Thurston, C. (1992). AN INVESTIGATION OF DYE REDUCTION BY FOOD-BORNE BACTERIA. *JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY*, 72(6) :479–485.
- [Lee et al., 1993] Lee, W., Wong, K., and Li, X. (1993). Luminescent dicyanoplatinum(II) complexes as sensors for the optical measurement of oxygen concentrations. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 65(3) :255–258.
- [Lee Company,] Lee Company. Datasheet de la micro-pompe à solénoïde LPLA1251650L. <http://www.theleeco.com/whats-new/pdf/PDS-LPL2-Inert-Solenoid-Pump.pdf>.
- [Lefevre et al., 2012] Lefevre, F., Chalifour, A., Yu, L., Chodavarapu, V., Juneau, P., and Izquierdo, R. (2012). Algal fluorescence sensor integrated into a microfluidic chip for water pollutant detection. *LAB ON A CHIP*, 12(4) :787–793.
- [Li et al., 1993] Li, X., Ruan, F., and Wong, K. (1993). Optical characteristics of a ruthenium(II) complex immobilized in a silicone rubber film for oxygen measurement. *ANALYST*, 118(3) :289–292.
- [Li and Chu, 1991] Li, Y. and Chu, J. (1991). STUDY OF BOD MICROBIAL SENSORS FOR WASTE-WATER TREATMENT CONTROL. *APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY*, 28(9) :855–863. 12TH SYMP ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, GATLINBURG, TN, MAY 07-11, 1990.
- [Lin et al., 2002] Lin, C., Lee, G., Chang, B., and Chang, G. (2002). A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photoresist. *JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING*, 12(5) :590–597.
- [Liu et al., 2012] Liu, C., Zhao, H., Zhong, L., Liu, C., Jia, J., Xu, X., Liu, L., and Dong, S. (2012). A biofilm reactor-based approach for rapid on-line determination of biodegradable organic pollutants. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 34(1) :77–82.

- [Liu et al., 2000] Liu, J., Bjornsson, L., and Mattiasson, B. (2000). Immobilised activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurement. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 14(12) :883–893.
- [Liu et al., 2004a] Liu, J., Olsson, G., and Mattiasson, B. (2004a). Short-term BOD (BODst) as a parameter for on-line monitoring of biological treatment process Part 1. A novel design of BOD biosensor for easy renewal of bio-receptor. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 20(3) :562–570.
- [Liu et al., 2004b] Liu, J., Olsson, G., and Mattiasson, B. (2004b). Short-term BOD (BODst) as a parameter for on-line monitoring of biological treatment process. Part II : Instrumentation of integrated flow injection analysis (FIA) system for BODst estimation. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 20(3) :571–578.
- [Liu, 2000] Liu, Y. (2000). The S₀/X₀-dependent dissolved organic carbon distribution in substrate-sufficient batch culture of activated sludge. *Water Research*, 34(5) :1645–1651.
- [Lorenz et al., 1998] Lorenz, H., Despont, M., Fahrni, N., Brugger, J., Vettiger, P., and Renaud, P. (1998). High-aspect-ratio, ultrathick, negative-tone near-UV photoresist and its applications for MEMS. *SENSORS AND ACTUATORS A-PHYSICAL*, 64(1) :33–39.
- [McDonald et al., 2000] McDonald, J., Duffy, D., Anderson, J., Chiu, D., Wu, H., Schueller, O., and Whitesides, G. (2000). Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *ELECTROPHORESIS*, 21(1) :27–40.
- [Meighen, 1993] Meighen, E. (1993). BACTERIAL BIOLUMINESCENCE - ORGANIZATION, REGULATION, AND APPLICATION OF THE LUX GENES. *FASEB JOURNAL*, 7(11) :1016–1022.
- [Mills and Lepre, 1997] Mills, A. and Lepre, A. (1997). Controlling the response characteristics of luminescent porphyrin plastic film sensors for oxygen. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 69(22) :4653–4659.
- [Mills et al., 1997] Mills, A., Lepre, A., Theobald, B., Slade, E., and Murrer, B. (1997). Use of luminescent gold compounds in the design of thin-film oxygen sensors. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 69(14) :2842–2847.
- [Mills and Thomas, 1997] Mills, A. and Thomas, M. (1997). Fluorescence-based thin plastic film ion-pair sensors for oxygen. *ANALYST*, 122(1) :63–68.
- [Mittler, 2002] Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS IN PLANT SCIENCE*, 7(9) :405–410.
- [Nakamura et al., 2007a] Nakamura, H., Abe, Y., Koizumi, R., Suzuki, K., Mogi, Y., Hirayama, T., and Karube, I. (2007a). A chemiluminescence biochemical oxygen demand measuring method. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, 602(1) :94–100.
- [Nakamura et al., 2007b] Nakamura, H., Kobayashi, S., Hirata, Y., Suzuki, K., Mogi, Y., and Karube, I. (2007b). A spectrophotometric biochemical oxygen demand determination method using 2,6-dichlorophenolindophenol as the redox color indicator and the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 369(2) :168–174.

Bibliographie

- [Nakamura et al., 2007c] Nakamura, H., Suzuki, K., Ishikuro, H., Kinoshita, S., Koizumi, R., Okuma, S., Gotoh, M., and Karube, I. (2007c). A new BOD estimation method employing a double-mediator system by ferricyanide and menadione using the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *TALANTA*, 72(1) :210–216.
- [Navier, 1827] Navier, H. (1827). Sur les lois de l'équilibre et du mouvement des corps solides élastiques. *Mémoires de l'Académie Royale des Sciences de l'Institut de France*, pages 375–393.
- [OCDE,] OCDE. Essai n° 301 : Biodégradabilité facile.
- [Oota et al., 2010] Oota, S., Hatae, Y., Amada, K., Koya, H., and Kawakami, M. (2010). Development of mediated BOD biosensor system of flow injection mode for shochu distillery wastewater. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 26(1) :262–266.
- [OSRAM,] OSRAM. Datasheet des LEDs LTN91E. <http://docs-europe.electrocomponents.com/webdocs/0dc7/0900766b80dc7811.pdf>.
- [Pandard and Rawson, 1993] Pandard, P. and Rawson, D. (1993). AN AMPEROMETRIC ALGAL BIO-SENSOR FOR HERBICIDE DETECTION EMPLOYING A CARBON CATHODE OXYGEN-ELECTRODE. *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND WATER QUALITY*, 8(3) :323–333.
- [Papkovsky et al., 1992] Papkovsky, D., OLAH, J., Troyanovsky, I., Sadovsky, N., Rumyantseva, V., Mironov, A., Yaropolov, A., and Savitsky, A. (1992). Phosphorescent polymer films for optical oxygen sensors. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 7(3) :199–206.
- [Park et al., 2005] Park, E., Reid, K., Tang, W., Kennedy, R., and Kopelman, R. (2005). Ratiometric fiber optic sensors for the detection of inter- and intra-cellular dissolved oxygen. *JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY*, 15(27-28) :2913–2919.
- [Parker,] Parker. Datasheet de l'électrovanne LQX12-3W12FF48-000. <http://www.parker.com/literature/LiteratureFiles/PrecisionFluidicsDivision/UpdatedFiles/LQX12DataSheet.pdf>.
- [Pasco et al., 2000] Pasco, N., Baronian, K., Jeffries, C., and Hay, J. (2000). Biochemical mediator demand – a novel rapid alternative for measuring biochemical oxygen demand. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5) :613–618.
- [Pietikainen et al., 2005] Pietikainen, J., Pettersson, M., and Baath, E. (2005). Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY*, 52(1) :49–58.
- [Preininger et al., 1994] Preininger, C., Klimant, I., and Wolfbeis, O. (1994). OPTICAL-FIBER SENSOR FOR BIOLOGICAL OXYGEN-DEMAND. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 66(11) :1841–1846.
- [PyroScience,] PyroScience. Les optodes de PyroScience. <http://www.pyro-science.com/media/files/ManualFireStingO2II.pdf>.
- [Qin et al., 1996] Qin, D., Xia, Y., and Whitesides, G. (1996). Rapid prototyping of complex structures with feature sizes larger than 20 μm . *ADVANCED MATERIALS*, 8(11) :917–919.

- [Rabaey and Verstraete, 2005] Rabaey, K. and Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells : novel biotechnology for energy generation. *TRENDS IN BIOTECHNOLOGY*, 23(6) :291–298.
- [Rabinowitz et al., 1998] Rabinowitz, J. D., Vacchino, J. F., Beeson, C., and McConnell, H. M. (1998). Potentiometric measurement of intracellular redox activity. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 120(10) :2464–2473.
- [Ramsay and Turner, 1988] Ramsay, G. and Turner, A. (1988). DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL METHOD FOR THE RAPID-DETERMINATION OF MICROBIAL CONCENTRATION AND EVIDENCE FOR THE REACTION-MECHANISM. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, 215(1-2) :61–69.
- [Rashidian et al., 2013] Rashidian, A., Aligodarz, M. T., Klymyshyn, D. M., Boerner, M., Shafai, L., and Mohr, J. (2013). Fabrication of Photoresist-Based Polymer Resonator Antennas Using Ultra-Thick SU-8 Based Dry Films. In *2013 IEEE ANTENNAS AND PROPAGATION SOCIETY INTERNATIONAL SYMPOSIUM (APSURSI)*, IEEE Antennas and Propagation Society International Symposium, pages 1298–1299. Inst Elect & Elect Engineers ; IEEE Antennas & Propagat Soc ; APS. International Symposium of the IEEE-Antennas-and-Propagation-Society, Orlando, FL, JUL 07-13, 2013.
- [Rastogi et al., 2003] Rastogi, S., Kumar, A., Mehra, N., Makhijani, S., Manoharan, A., Gangal, V., and Kumar, R. (2003). Development and characterization of a novel immobilized microbial membrane for rapid determination of biochemical oxygen demand load in industrial waste-waters. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 18(1) :23–29.
- [Raud and Kikas, 2013] Raud, M. and Kikas, T. (2013). Bioelectronic tongue and multivariate analysis : A next step in BOD measurements. *WATER RESEARCH*, 47(7) :2555–2562.
- [Reiss et al., 1998] Reiss, M., Heibges, A., Metzger, J., and Hartmeier, W. (1998). Determination of BOD-values of starch-containing waste water by a BOD-biosensor. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 13(10) :1083–1090. 5th World Congress on Biosensors, BERLIN, GERMANY, JUN 03-05, 1998.
- [Ren and Frymier, 2002] Ren, S. and Frymier, P. (2002). Estimating the toxicities of organic chemicals to bioluminescent bacteria and activated sludge. *WATER RESEARCH*, 36(17) :4406–4414.
- [Riedel et al., 2002] Riedel, K., Kunze, G., and König, A. (2002). Microbial sensors on a respiratory basis for wastewater monitoring. In Dutta, N., Hammar, F., Haralampidis, K., Karanth, N., König, A., Krishna, S., Kunze, G., Nagy, E., Orlich, B., Osbourn, A., Raghavarao, K., Riedel, K., Sahoo, G., Schomäcker, R., Srinivas, N., and Trojanowska, M., editors, *History and Trends in Bioprocessing and Biotransformation*, volume 75 of *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pages 81–118. Springer Berlin Heidelberg.
- [Rocher et al., 2011] Rocher, V., Meche, P., Rechdaoui, S., Paffoni, C., Goncalves, A., Pichon, S., and Pauss, A. (2011). De nouveaux outils de dosage du PO₄ et de la DBO dans les eaux résiduaires urbaines. *L'Eau, l'industrie, les nuisances*, 346 :143–149.
- [Rolinson, 1980] Rolinson, G. (1980). EFFECT OF BETA-LACTAM ANTIBIOTICS ON BACTERIAL-CELL GROWTH-RATE. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY*, 120(OCT) :317–323.

Bibliographie

- [Roller et al., 1984] Roller, S., Bennetto, H., Delaney, G., Mason, J., Stirling, J., and Thurston, C. (1984). ELECTRON-TRANSFER COUPLING IN MICROBIAL FUEL-CELLS .1. COMPARISON OF REDOX-MEDIATOR REDUCTION RATES AND RESPIRATORY RATES OF BACTERIA. *JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY B-BIOTECHNOLOGY*, 34(1) :3–12.
- [Royal Commission on Sewage Disposal, 1915] Royal Commission on Sewage Disposal (1915). *Final Report of the Commissioners Appointed to Inquire and Report what Methods of Treating and Disposing of Sewage (including Any Liquid from Any Factory Or Manufacturing Process) May Properly be Adopted : General Summary of Conclusions and Recommendations* Cd. (Great Britain. Parliament). H.M. Stationery Office.
- [Sakaguchi et al., 2003] Sakaguchi, T., Kitagawa, K., Ando, T., Murakami, Y., Morita, Y., Yamamura, A., Yokoyama, K., and Tamiya, E. (2003). A rapid BOD sensing system using luminescent recombinants of *Escherichia coli*. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 19(2) :115–121.
- [Sakaguchi et al., 2007] Sakaguchi, T., Morioka, Y., Yamasaki, M., Iwanaga, J., Beppu, K., Maeda, H., Morita, Y., and Tamiya, E. (2007). Rapid and onsite BOD sensing system using luminous bacterial cells-immobilized chip. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 22(7) :1345–1350.
- [Schubnell et al., 1999] Schubnell, D., Lehmann, M., Baumann, W., Rott, F., Wolf, B., and Beck, C. (1999). An ISFET-algal (*Chlamydomonas*) hybrid provides a system for eco-toxicological tests. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 14(5) :465–472.
- [Seto and Alexander, 1985] Seto, M. and Alexander, M. (1985). EFFECT OF BACTERIAL DENSITY AND SUBSTRATE CONCENTRATION ON YIELD COEFFICIENTS. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 50(5) :1132–1136.
- [Sixt et al., 1995] Sixt, S., Altschuh, J., and Bruggemann, R. (1995). QUANTITATIVE STRUCTURE-TOXICITY RELATIONSHIPS FOR 80 CHLORINATED COMPOUNDS USING QUANTUM-CHEMICAL DESCRIPTORS. *CHEMOSPHERE*, 30(12) :2397–2414.
- [Skalar,] Skalar. Analyseurs DBO robotisés. <http://fr.skalar.com/analyseurs/analyseurs-robotises>.
- [Sung and Lee, 2004] Sung, N. and Lee, C. (2004). Coregulation of lux genes and riboflavin genes in bioluminescent bacteria of *Photobacterium phosphoreum*. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY*, 42(3) :194–199.
- [Suriyawattanakul et al., 2002] Suriyawattanakul, L., Surareungchai, W., Sritongkam, P., Tanticharoen, M., and Kirtikara, K. (2002). The use of co-immobilization of *Trichosporon cutaneum* and *Bacillus licheniformis* for a BOD sensor. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 59(1) :40–44.
- [Sylgard,] Sylgard. Informations sur le PDMS Sylgard 184. <http://www.dowcorning.com/DataFiles/090276fe80190b08.pdf>.
- [Tabeling, 2003] Tabeling, P. (2003). *Introduction à la microfluidique*. Editions Belin.
- [Texas Instrument,] Texas Instrument. Datasheet des photodiodes OPT301. <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/opt301.pdf>.

- [Thermo Scientific,] Thermo Scientific. Site internet présentant un fluorimètre à base de photomultiplicateur. <http://www.thermoscientific.fr/product/fluoroskan-ascent-microplate-fluorometer.html>.
- [Thouand et al., 1996] Thouand, G., Capdeville, B., and Block, J. (1996). Preadapted inocula for limiting the risk of errors in biodegradability tests. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY*, 33(3) :261–267.
- [Thouand et al., 1995] Thouand, G., Friant, P., Bois, F., Cartier, A., Maul, A., and Block, J. (1995). BACTERIAL INOCULUM DENSITY AND PROBABILITY OF PARA-NITROPHENOL BIODEGRADABILITY TEST RESPONSE. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY*, 30(3) :274–282.
- [Timur et al., 2007] Timur, S., Anik, U., Odaci, D., and Gorton, L. (2007). Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes. *ELECTROCHEMISTRY COMMUNICATIONS*, 9(7) :1810–1815.
- [Tizzard et al., 2006] Tizzard, A. C., Bergsma, J. H., and Lloyd-Jones, G. (2006). A resazurin-based biosensor for organic pollutants. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 22(5) :759–763.
- [Torrents et al., 2012] Torrents, A., Mas, J., Xavier Munoz, F., and Javier del Campo, F. (2012). Design of a microfluidic respirometer for semi-continuous amperometric short time biochemical oxygen demand (BODst) analysis. *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 66 :27–37.
- [Trosok et al., 2001] Trosok, S., Driscoll, B., and Luong, J. (2001). Mediated microbial biosensor using a novel yeast strain for wastewater BOD measurement. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 56(3-4) :550–554.
- [Tsopela et al., 2014] Tsopela, A., Lale, A., Vanhove, E., Reynes, O., Seguy, I., Temple-Boyer, P., Juneau, P., Izquierdo, R., and Launay, J. (2014). Integrated electrochemical biosensor based on algal metabolism for water toxicity analysis. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 61 :290–297.
- [Verhulst, 1938] Verhulst, P.-F. (1938). Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Correspondance mathématique et physique*, 10 :113–121.
- [Vernimmen et al., 1967] Vernimmen, A. P., Henken, E. R., and Lamb, J. C. r. (1967). A short-term biochemical oxygen demand test. *Water Pollution Control Federation*, 39(6) :1006–1020.
- [Villalobos et al., 2010] Villalobos, P., Acevedo, C. A., Albornoz, F., Sanchez, E., Valdes, E., Galindo, R., and Young, M. E. (2010). A BOD monitoring disposable reactor with alginate-entrapped bacteria. *BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING*, 33(8) :961–970.
- [Wang et al., 2007] Wang, J., Fang, F., and Yu, H.-Q. (2007). Substrate consumption and biomass growth of *Ralstonia eutropha* at various S-0/X-0 levels in batch cultures. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 98(13) :2599–2604.
- [Wang et al., 2010] Wang, J., Zhang, Y., Wang, Y., Xu, R., Sun, Z., and Jie, Z. (2010). An innovative reactor-type biosensor for BOD rapid measurement. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 25(7) :1705–1709.
- [Wang and Lu, 2009] Wang, M. and Lu, Y. (2009). Nano patterned PDMS for periodontal ligament fibroblast culture. *SURFACE & COATINGS TECHNOLOGY*, 204(4) :525–530.

Bibliographie

- [Watanabe and Hastings, 1986] Watanabe, H. and Hastings, J. (1986). EXPRESSION OF LUMINESCENCE IN PHOTOBACTERIUM-PHOSPHOREUM - Na^+ REGULATION OF INVIVO LUMINESCENCE APPEARANCE. *ARCHIVES OF MICROBIOLOGY*, 145(4) :342–346.
- [Whiting and Buchanan, 1993] Whiting, R. and Buchanan, R. (1993). A CLASSIFICATION OF MODELS IN PREDICTIVE MICROBIOLOGY - REPLY. *FOOD MICROBIOLOGY*, 10(2) :175–177.
- [Wikipedia,] Wikipedia. Bactérie. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Bacteria>.
- [WTW,] WTW. Sondes galvaniques à oxygène dissous. <http://www.wtw.de/fr/produits/laboratoire/oxygene/sondes.html>.
- [Xia et al., 2010] Xia, S., Duan, L., Song, Y., Li, J., Piceno, Y. M., Andersen, G. L., Alvarez-Cohen, L., Moreno-Andrade, I., Huang, C.-L., and Hermanowicz, S. W. (2010). Bacterial Community Structure in Geographically Distributed Biological Wastewater Treatment Reactors. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 44(19, SI) :7391–7396.
- [Yashiki and Yamashoji, 1996] Yashiki, Y. and Yamashoji, S. (1996). Extracellular reduction of menadione and ferricyanide in yeast cell suspension. *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING*, 82(3) :319–321.
- [Yoshida et al., 2000] Yoshida, N., Yano, K., Morita, T., McNiven, S., Nakamura, H., and Karube, I. (2000). A mediator-type biosensor as a new approach to biochemical oxygen demand estimation. *ANALYST*, 125(12) :2280–2284.
- [Yotter and Wilson, 2004] Yotter, R. and Wilson, D. (2004). Sensor technologies for monitoring metabolic activity in single cells - Part II : Nonoptical methods and applications. *IEEE SENSORS JOURNAL*, 4(4) :412–429.
- [Zamora and Zaritzky, 1985] Zamora, M. and Zaritzky, N. (1985). MODELING OF MICROBIAL-GROWTH IN REFRIGERATED PACKAGED BEEF. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 50(4) :1003–1006.
- [Zhang and Angelidaki, 2011] Zhang, Y. and Angelidaki, I. (2011). Submersible Microbial Fuel Cell Sensor for Monitoring Microbial Activity and BOD in Groundwater : Focusing on Impact of Anodic Biofilm on Sensor Applicability. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 108(10) :2339–2347.
- [Zuberer and Kenerley, 1993] Zuberer, D. and Kenerley, C. (1993). SEASONAL DYNAMICS OF BACTERIAL-COLONIZATION OF COTTON FIBER AND EFFECTS OF MOISTURE ON GROWTH OF BACTERIA WITHIN THE COTTON BOLL. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 59(4) :974–980.

Annexes

A L'écoulement en microfluidique

A.1 Équations des écoulements

Les mouvements des fluides ont été décrits pour la première fois par Navier en 1827 [Navier, 1827]. Au premier abord, l'équation de Navier-Stokes (15) est difficile à comprendre. Cependant, nous pouvons en faire une analogie avec l'équation de Newton, à savoir «*Somme des forces = m.a*», avec m la masse et a l'accélération. Nous allons admettre, dans un fluide incompressible, deux types de forces : les forces de pression, et les forces visqueuses. En considérant un champ vitesse $v(r, t)$, de pression $p(r, t)$ et des forces externes $f(r, t)$ fonctions de l'espace et du temps, l'équation s'écrit alors :

$$\underbrace{\rho}_m \underbrace{\left(\frac{\partial v}{\partial t} + v \nabla v \right)}_a = \underbrace{-\nabla p}_{\text{Forces de pression}} + \underbrace{\mu \Delta v}_{\text{Forces visqueuses}} + \underbrace{f}_{\text{Forces externes}} \quad (15)$$

Avec ρ la masse volumique du fluide et μ sa viscosité dynamique.

Selon l'écoulement, des approximations peuvent faciliter la résolution de l'équation de Navier-Stokes. Pour déterminer l'écoulement en jeu, laminaire ou turbulent, il faut calculer le nombre de Reynolds. C'est un nombre sans dimension qui permet de comparer les forces inertielles aux forces visqueuses (Equation 16).

$$Re = \frac{\text{Forces inertielles}}{\text{Forces visqueuses}} = \frac{\rho U L}{\mu} \quad (16)$$

Où ρ et μ sont respectivement la masse volumique et la viscosité dynamique du fluide, U la vitesse moyenne du fluide et L la longueur caractéristique de la canalisation.

Avila et al. [Avila et al., 2011] ont déterminé, expérimentalement, la valeur critique du nombre de Reynolds à laquelle les fluides passent de l'écoulement laminaire à celui de turbulent : $Re = 2040$. Ainsi, en deçà de ce nombre, le régime est laminaire et au-delà le régime est turbulent.

En négligeant certains facteurs physiques, dans le cas d'un écoulement laminaire, comme par exemple : des forces inertielles petites devant les forces visqueuses, des forces externes nulles et un régime fluide à l'état stationnaire, alors l'équation 15 se réduit alors à la forme linéaire :

$$-\nabla p + \mu \Delta v + f = 0 \quad (17)$$

Dans certains cas particuliers, cette équation peut être résolue plus aisément. Nous allons voir dans le paragraphe suivant comment l'équation 17 permet de lier directement le débit et la pression, dans le cas de canalisations circulaires et rectangulaires. Nous verrons, par ailleurs, qu'il est possible d'effectuer une analogie entre l'hydrodynamique et l'électronique.

A.2 Écoulement fluide au sein d'une canalisation circulaire

Nous nous pencherons, ici, sur l'étude du profil de vitesse d'un écoulement laminaire au sein d'une canalisation rectiligne et de section circulaire.

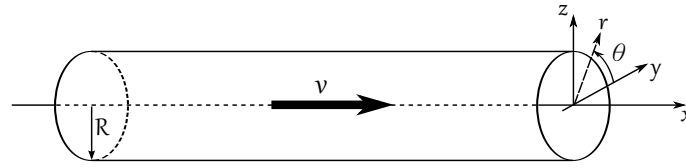


FIGURE 20 – Repère associé à une canalisation circulaire

Nous considérons la longueur L de la canalisation et de rayon R dans lequel s'écoule un fluide de viscosité μ . En prenant pour hypothèse que l'écoulement est laminaire, donc à nombre de Reynolds faible, la vitesse du fluide s'écrit dans un repère orthonormé cylindrique $\vec{v} = u(x, r, \theta) \vec{e}_x$. Pour connaître le profil de vitesse, nous allons résoudre l'équation 17. Le fluide de l'étude est incompressible, de ce fait, l'équation de conservation de la masse se résume à $\nabla \cdot v = 0$. De plus, $\frac{\partial u}{\partial x} = 0$ car la vitesse n'évolue pas le long de l'axe de la conduite, et compte tenu de la symétrie de révolution de la conduite, on en déduit que $\frac{\partial u}{\partial \theta} = 0$. Ainsi, nous pouvons en conclure que le vecteur vitesse est purement axial et ne dépend que de r .

En développant le laplacien et en tenant compte du fait que u ne dépend que de r , l'expression de l'équation de Stokes donne alors en coordonnées cylindriques le système suivant :

$$\begin{cases} \frac{\partial P}{\partial x} = \mu \left(\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial u}{\partial r} \right) \right) \\ \frac{\partial P}{\partial r} = 0 \\ \frac{\partial P}{\partial \theta} = 0 \end{cases} \quad (18)$$

Nous pouvons conclure que P ne dépend que de x (car $\frac{\partial u}{\partial x} = \frac{\partial u}{\partial \theta} = 0$) et que la pression varie linéairement le long de x , et donc $\frac{\partial P}{\partial x} = K$. Nous pouvons alors déterminer le profil de vitesse $u(r)$ en remplaçant $\frac{\partial P}{\partial x} = K$ dans 18 et en résolvant cette dernière équation, nous obtenons le profil de vitesse :

$$u(r) = \frac{K}{4\mu} r^2 + K' \ln(r) + K'' \quad (19)$$

K' et K'' sont deux constants d'intégration dont l'indétermination peut être levée en appliquant les conditions aux limites. On sait que la vitesse est nulle à l'interface solide-liquide ($u(r = R) = 0$) et que la vitesse est maximale sur l'axe de la conduite en $r = 0$. Le profil de vitesse peut alors se formuler :

$$u(r) = -\frac{K}{4\mu} (R^2 - r^2) \text{ où } 0 \leq r \leq R \quad (20)$$

Si on définit la vitesse moyenne comme le rapport du débit volumique sur la section de la conduite, on a :

$$\langle u \rangle = \frac{Q_V}{S} = \frac{1}{\pi R^2} \iint u(r) dS = -\frac{K}{8\mu} R^2 \quad (21)$$

Comme $\Delta P = -\frac{dP}{dx} \Delta x = -K \Delta x$ et $S = \pi R^2$, nous pouvons alors écrire le débit volumique Q_V dans une conduite de longueur $\Delta x = L$:

$$Q_V = -\frac{K}{8\mu} R^2 S = \frac{\pi R^4}{8\mu L} \Delta P \quad (22)$$

En écrivant l'équation 22 selon ΔP , alors nous trouvons la formule de Poiseuille.

A.3 Écoulement fluide au sein d'une canalisation rectangulaire

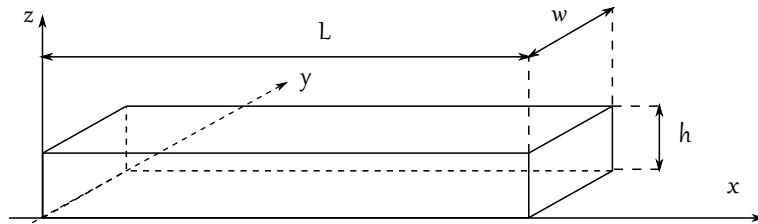


FIGURE 21 – Repère associé à une canalisation de section rectangulaire

Dans le cas des puces microfluidiques, les canalisations sont de section rectangulaire. Le profil de vitesse de l'écoulement au sein de ce type de canalisation peut être étudié en reprenant le même raisonnement que pour une canalisation circulaire. En effet, en désignant la longueur de la canalisation L , sa largeur w et sa hauteur h , la vitesse du fluide peut alors s'écrire, dans un repère orthonormé

cartésien, $\vec{v} = u(x, y, z)\vec{e}_x$. Ainsi, le système 18 devient :

$$\begin{cases} \frac{\partial P}{\partial x} = \mu \left(\frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right) \\ \frac{\partial P}{\partial y} = 0 \\ \frac{\partial P}{\partial z} = 0 \end{cases} \quad (23)$$

Dans les mêmes conditions que dans la partie précédente, la pression varie linéairement le long de x et donc $\frac{\partial P}{\partial x} = K$. En appliquant les conditions aux limites $u(y = (0, w), z) = 0 \forall z$ et $u(y, z = (0, h)) = 0 \forall y$, l'équation peut être résolue par décomposition en série de Fourier. L'expression de $u(x, y)$ obtenue est :

$$u(y, z) = \frac{8K}{\mu w} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{\beta_n^3} \left(1 - \frac{\cosh(\beta_n z)}{\cosh(\beta_n \frac{h}{2})} \right) \cos(\beta_n y) \quad (24)$$

avec $\beta_n = (2n - 1) \frac{\pi}{w}$

En intégrant cette expression sur la totalité de la section de la canalisation et sachant que $K = \frac{\Delta P}{L}$, nous obtenons l'expression du débit :

$$Q_V = \iint u(y, z) dz dy \quad (25)$$

$$Q_V = \frac{8\Delta P h}{\mu L w} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\beta_n^4} \left(1 - \frac{2}{\beta_n} \tanh\left(\beta_n \frac{w}{2}\right) \right)$$

Cette expression peut être simplifiée afin d'obtenir une estimation approchée du débit (à 10% près d'après Tabeling [Tabeling, 2003]), le débit s'exprime alors :

$$Q_V = \frac{wh^3}{12\mu L} \left(1 - \frac{6 \times 2^5 h}{\pi^5 w} \right) \Delta P \quad (26)$$

Dans le cas de canaux ayant un rapport d'aspect important ($\frac{w}{h} > 10$), l'expression 26 peut être encore simplifiée. La relation entre le débit et la pression est alors simple et devient :

$$Q_V = \frac{wh^3}{12\mu L} \Delta P \quad (27)$$

A.4 Analogie avec les circuits électriques

La relation entre la différence de pression ΔP et le débit Q dans une canalisation peut être comparée à l'une des lois les plus connues en électronique : la loi d'Ohm ($U = R \times I$). En effet, en définissant que la

différence de potentiel U est égale à la différence de pression ΔP , et le courant I est égal au débit Q , alors nous pouvons réécrire la loi d'Ohm en terme fluidique :

$$\Delta P = R_h \times Q \quad (28)$$

Avec R_h la résistance hydrodynamique. Elle ne dépend, finalement, que des grandeurs de la canalisation si l'on compare l'équation 28 avec l'équation 26 ou l'équation 22. Cette analogie est intéressante pour modéliser des circuits microfluidiques, cela nous permet de dimensionner facilement les microdispositifs et de connaître la répartition des fluides entre les différentes branches. Pour cela, il suffit d'écrire le schéma électrique équivalent du circuit fluidique. Nous pouvons alors connaître les débits et les pressions dans les différentes branches, en appliquant la loi des nœuds et la loi des mailles.

B Validation du gradient

Le gradient décrit dans la partie 2.4.1.2 du chapitre 2 a été testé et caractérisé afin de valider la bonne répartition des fluides. Rappelons l'architecture du gradient de concentration :

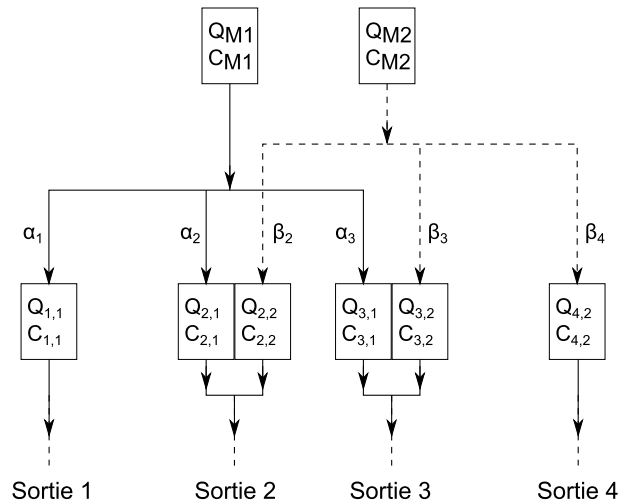


FIGURE 22 – Architecture du gradient de concentration décrit dans la partie 2.4.1.2 du chapitre 2.

Pour valider le gradient, nous avons utilisé une micro-pompe à solénoïde injectant $50 \mu l$ par impulsion. L'ensemble ne comportant aucune fuite, nous pouvons donc aisément admettre que la totalité du fluide entrant dans le système à gradient de concentration se retrouve finalement répartie sur les trois sorties du système. Des récipients ont été placés sur les trois sorties du système à gradient, et auparavant pesés individuellement. Les récipients sont à nouveau pesés après injection du fluide. Le tableau 4 résume les différents essais menés, et permet de déterminer la moyenne des répartitions mesurées. Les valeurs indiquées sont en pourcentage de la concentration initiale, soit en pourcentage de la masse mesurée dans le récipient 1.

Essai	Récipient		
	1	2	3
Essai n°1	100 %	84,2 %	45,8 %
Essai n°2	100 %	84,1 %	49,7 %
Essai n°3	100 %	83,4 %	48,3 %
Essai n°4	100 %	83,4 %	48,7 %
Moyenne	100 %	83,8 %	48,1 %

TABLEAU 4 – Résumé de la répartition fluidique en masse des récipients mesurée lors des différents essais

Les résultats montrent qu'il y a un décalage entre les calculs théoriques et les résultats expérimentaux. Cette différence peut être due à l'imprécision de la découpe des capillaires, ou au comportement de la croix microfluidique. En effet, une mauvaise découpe peut induire une modification de la longueur,

ou même, un écrasement de la canalisation au niveau du point de découpe, et ainsi créer, localement, une modification de la résistance hydrodynamique. Le comportement du fluide à l'intérieur de la croix peut également poser problème. Le fluide est-il bien réparti dans les trois branches ? Existe-t-il localement un écoulement turbulent qui viendrait perturber la répartition du fluide ? Face à la complexité de ces questions, nous avons choisi de ne pas résoudre ce problème théoriquement, mais d'y répondre empiriquement. En enlevant 2 mm au capillaire 1, nous avons montré que nous obtenions de bons résultats. Nous avons réalisé la symétrie de ce gradient afin de pouvoir tester l'ensemble avec une solution mère contenant une molécule fluorescente d'un côté et de l'autre le diluant (eau DI). En connaissant le coefficient d'extinction molaire de cette molécule, nous pouvons remonter à sa concentration et donc valider le fonctionnement du gradient (Tableau 5).

Sortie du gradient	Absorbance mesurée	Concentration molaire (μM)	Concentration par rapport à la solution mère (%)
Sortie n°1	0,84	96,56	100
Sortie n°2	0,447	54,84	56,79
Sortie n°3	0,335	38,51	39,88
Sortie n°4	0	0	0

TABLEAU 5 – Tableau validant le fonctionnement du gradient de concentration, mesuré par fluorescence

C Écriture du modèle de Verhulst sous une forme affine

L'équation différentielle décrivant la croissance bactérienne, proposée par Verhulst, est :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot \left(1 - \frac{X}{X_M}\right) \cdot X \quad (29)$$

Qui peut s'écrire :

$$\int \frac{X_M}{X \cdot (X_M - X)} \cdot dX = \int \mu \cdot t \quad (30)$$

Et sachant que :

$$\int \frac{1}{x \cdot (a - x)} = \frac{\ln(x) - \ln(a - x)}{a} \quad (31)$$

L'équation 30 devient :

$$X_M \cdot \left[\frac{\ln(X) - \ln(X_M - X)}{X_M} \right]_{X_0}^X = \mu \cdot t \quad (32)$$

Finalement :

$$\ln\left(\frac{X}{X_M - X}\right) = \mu \cdot t + \ln\left(\frac{X_0}{X_M - X_0}\right) \quad (33)$$